

**Untersuchungen zur Kinetik des Wachstums von
Trichophyton mentagrophytes und Candida albicans
in einem New Brunswick-Fermentor und zum Nachweis
von proteolytischen Ekto-Enzymen**

Walter Höbel

1975

Aus der Dermatologischen Klinik und Poliklinik
der Universität München

Direktor: Prof. Dr. O. Braun-Falco

Untersuchungen zur Kinetik des Wachstums von
Trichophyton mentagrophytes und Candida albi-
cans in einem New Brunswick-Fermentor und zum
Nachweis von proteolytischen Ekto-Enzymen.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Walter Höbel

München

1975

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität
München

Berichterstatter: Professor Dr. W. Meinhof

Mitberichterstatter: Professor Dr. O. Braun-Falco

Dekan: Professor Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 6. Mai 1975



Inhaltsverzeichnis

Seite

1.	Einleitung	1
2.	Zur Wachstumsphysiologie der Dermatophyten	4
2.1.	Pleomorphie der Dermatophyten	4
2.2.	Nährstoffbedarf der Dermatophyten	6
2.2.1.	Wachstum auf natürlichen komplexen Medien	6
2.2.2.	Stickstoffernährung der Dermatophyten	7
2.2.3.	Kohlehydraternährung der Dermatophyten	11
2.2.4.	Der Bedarf der Dermatophyten an Mineralstoffen	13
2.2.5.	Einfluß von Vitaminen auf das Wachstum von Dermatophyten	14
2.2.6.	Einfluß von Phytohormonen auf das Wachstum von Dermatophyten	14
2.3.	Einfluß des pH-Wertes und der Temperatur auf das Wachstum der Pilze	15
2.4.	Verhalten der Dermatophyten bei unterschiedlichen Temperaturen	17
2.5.	Die Enzyme der Dermatophyten	17
2.6.	Wachstumskinetik der Dermatophyten	21
2.7.	Allgemeine Bemerkungen zur Wachstumskinetik von Mikroorganismen	22
3.	Fragestellung der vorliegenden Untersuchung	26
4.	Material und Methodik	27
4.1.	Verwendete Testorganismen	27
4.2.	Verwendete Nährmedien und Zusätze	27
4.3.	Verwendung des Microferm-Tischfermentors der New Brunswick Sci. Company	29
4.4.	Herstellung von Suspensionen mit dem Ultrathurrax-Homogenisator	30
4.5.	Kontrollmethoden des Wachstumsverlaufs	31

5.	Eigene Ergebnisse	34
5.1.	Vorversuche mit antibiotischen Zusätzen zur Sicherung eines sterilen Versuchsablaufs	34
5.2.	Vorversuche zur Bestimmung der lag-Phase	36
5.3.	Fermentorversuche	37
5.3.1.	Versuche mit komplexem Nährmedium (Kimmignährlösung)	37
5.3.2.	Versuche mit synthetischen Nährlösungen	44
5.3.3.	Versuche mit <i>Candida albicans</i> und <i>Pityrosporum</i> ovale	55
5.3.4.	Ergebnisse mit <i>Candida albicans</i>	56
5.3.5.	Ergebnisse mit <i>Pityrosporum ovale</i>	56
6.	Diskussion der Versuchsergebnisse	58
6.1.	Einfluß von Temperatur und Umdrehungszahlen	58
6.2.	Zur Morphologie der Kulturen	60
6.3.	Veränderung des pH-Wertes	61
6.4.	Veränderung des Trocken- und Frischgewichts	61
6.5.	Veränderung des Eiweißgehalts	61
6.6.	Enzymaktivitäten	62
6.7.	Einfluß der Giberillinsäure	62
6.8.	Wirkung der synthetischen Nährmedien	62
6.9.	Vergleich der Untersuchungsergebnisse mit denen der Hefepilze	63
7.	Anhang: Untersuchungen zum Nachweis von Proteinasen bei <i>Trichophyton mentagrophytes</i> mit den Sub- straten Azocoll ^R und Congocoll ^R	64
8.	Zusammenfassung	66
9.	Literaturverzeichnis	68

1. Einleitung

Die menschenpathogenen Pilze gewinnen in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung in der dermatologischen Fragestellung. Die Zahl der Pilzerkrankungen ist ständig im Steigen begriffen, ein Phänomen, für das jetzt noch keine befriedigende Erklärung gefunden werden konnte, schreibt STEPPERT (66) 1965. Eine sehr große Rolle scheint der oft allzu kritiklose Einsatz der verschiedenen Antibiotika zu spielen. Durch die Anwendung von Breitband-Antibiotika wird die gesamte Bakterienbesiedelung des menschlichen Körpers vernichtet. Es kommt zu einer Resistenzschwäche des Körpers gegenüber pathogenen Keimen. Das biologische Gleichgewicht zwischen Bakterien und saprophytären Pilzen wird empfindlich gestört FEGELER (16) 1959. Genauer gesagt, die Toleranzgrenze des Körpers für parasitäre Keime wird herabgedrückt KOCH (33).

Aufgrund dieser Situation sieht sich die Dermatologie einer wachsenden Problematik in Fragen der Mykosenbehandlung gegenüber. Trotz Herstellung vieler wirksamer fungizider und fungistatischer Substanzen sind eine Reihe von Problemen in der Mykologie noch weitgehend ungelöst. Einer der entscheidendsten und noch nicht geklärten Punkte ist das Wachstumsverhalten der verschiedenen Pilze und ihre Beeinflussbarkeit sowohl im Hinblick auf eine Wachstumsförderung, als auch auf eine Wachstumshemmung.

Von besonderem Interesse hinsichtlich seines Verhaltens gegenüber seiner unmittelbaren Umwelt ist der Dermatophyt Trichophyton mentagrophytes. Er ist für die Humanmedizin einer der wichtigsten Pilze, da er einen großen Prozentsatz aller Hand- und Fußmykosen verursacht. Auch RUECKER (61) fand 1951, daß in Europa und Asien das Hauptkontingent aller Trichophytien und Epidermophytien von

Pilzen der *Trichophyton gypseum* und *Rubrum*-Gruppe bestritten wird. Nicht umsonst ist diese eine der am besten untersuchten Gruppe von Dermatophyten. Die Entdeckung und Einordnung von *Trichophyton mentagrophytes* in die Gruppe der *Trichophyton gypseum*-Reihe erfolgt 1895 durch BLANCHARD.

An dieser Stelle sei kurz auf das System und die Morphologie der Dermatophyten verwiesen. Nach neueren Einteilungen wird *Trichophyton mentagrophytes* a) in die Klasse der *Fungi imperfecti*, b) in die Ordnung der *Hyphomycetales*, c) in die Familie der *Moniliaceae* eingeordnet. Die Pilze der *Trichophytongattung* bilden Makrokonidien, die an den Enden abgestumpft und in vier bis acht Kammern unterteilt sind. Oft werden sie nur in sehr geringer Zahl gebildet oder fehlen überhaupt. Die Mikrokonidien sind rundlich bis birnenförmig, einzellig und werden in großer Zahl traubenförmig oder entlang den Hyphen gebildet. Außerdem kommen gelegentlich, besonders bei Pilzen der faviformen Gruppe, glatte, gummiartige, zerfurchte und gewundene Kolonien vor, die lange Zeit weder Mikro- noch Makrokonidien bilden, sondern große Mengen von Chlamydosporen hervorbringen. Makro- und Mikrokonidien werden im allgemeinen vom Luftmycel und die Chlamydosporen nur vom vegetativen Mycel im Nährboden gebildet. Als Chlamydosporen werden Hüllesporen bezeichnet, d.h. es sind rundliche oder ovale, dickwandige, doppelt konturierte große Zellen, die allerdings nur äußerst selten zu sehen sind.

Die genannten Fruchtformen werden von den Dermatophyten nur in der saprophytären Phase gebildet. In der parasitären Phase des Wachstums sind derartige Fruchtformen nicht zu finden. Die Pilze bilden dann nur Mycel und die sogenannten Mycelsporen aus.

Bei Dermatophyten war es bisher nicht möglich, in vitro Formen zu züchten, die ein parasitäres Wachstum zeigen. RAUBITSCHKE (52) fand zwar in Schüttelkulturen Dermatophyten, die in ihrer ausschließlichen Mycelbildung der parasitären Wachstumsphase sehr nahe kamen. Er bezeichnete dies als die pseudoparasitische Wachstumsphase.

2. Zur Wachstumsphysiologie der Dermatophyten

2.1. Pleomorphie der Dermatophyten

Nach dieser kurzen Übersicht über die Einteilung und Morphologie der Dermatophyten ist es zunächst das Naheliegendste, in der Literaturübersicht einen Einblick in die Untersuchungen über eine ihrer Eigentümlichkeiten, nämlich ihre Neigung zur Pleomorphie zu geben.

SABOURAUD (62) stellte 1910 bei Untersuchungen zur Systematik der Dermatophyten das Gesetz von der Spezifität der Arten auf. Bei Dermatophyten ließ sich dies Gesetz der Artenspezifität nicht aufrechterhalten.

Es wurde durch das Gesetz der Variabilität ersetzt BOHME (4).

Er kam zu folgender grundlegender Aussage:

Das Wachstum verschiedener Pilze kann in vitro und in vivo gleich oder sehr ähnlich, dasjenige gleichartiger Pilze kann dagegen verschieden sein.

Der Begriff der Pleomorphie ist seit SABOURAUD bekannt und wurde von ihm in die Dermatologie eingeführt. Mit diesem Begriff bezeichnet man im allgemeinen die Erscheinung, daß bei dem gleichen Pilz mehrere unabhängige Fruchtkörper, d.h. Sporenformen vorkommen. Bei den Dermatophyten zeigt sich die Pleomorphie meist durch abnehmende Makro- und Mikrokonidienbildung und durch zunehmende Mycelbildung. Erwähnt sei außerdem der Verlust des Pigments. Pleomorphe sind außerdem raschwüchsiger und weniger virulent als normale Stämme. MOSHER (44) et al, ROBBINS und MA (59), NICKERSON und WILLIAMS (47), sowie McVEIGH (60) berichten über Stämme von Dermatophyten, die in der Lage waren,

anorganischen Stickstoff als einzige Stickstoffquelle zu nutzen, vor allem Ammoniumnitrat, während normale Stämme Überwiegend auf organisch gebundenen Stickstoff angewiesen waren. Auch FUJII (17) fand eine größere Zahl von Aminosäuren für pleomorphe Stämme verwertbar als für normale Stämme.

KLEIN (32) untersuchte die Wirkung der Ernährung durch Kohlehydrate und Stickstoff auf die Neigung von *Trichophyton mentagrophytes* zum Pleomorphismus. Keine der getesteten Kohlehydratverbindungen unterstützte die Neigung zum Pleomorphismus. Manche Stämme von *Trichophyton mentagrophytes* wuchsen bei einer Temperatur von 35 Grad Celsius pleomorph, bei Zugabe von Kohlehydrat und Stickstoffquellen, während andere Stämme keinerlei Wirkung zeigten. Zur Untersuchung verwendete die Autorin ein anorganisches Basalmedium, das Mangansulfat und Kaliumdihydrogenphosphat enthielt, dem nun in wechselnder Dosierung die verschiedenen Kohlehydrate und Stickstoffquellen zugegeben wurden.

Die Testung der Zucker erfolgte bei einer Konzentration von 2 %. Die Neigung zur Pleomorphie war bei diesen Versuchen abhängig von der Schnelligkeit des Gesamtwachstums. Je größer das Gesamtwachstum, umsomehr pleomorphe Entgleisung der verschiedenen Stämme. Die größte Neigung zur Pleomorphie wurde mit Ernährung durch Mannose erzielt. Mit Verwendung von Mannose konnte außerdem der größte Zuwachs an Trockengewicht erzielt werden. Lactose dagegen verwerteten die *Trichophyton*stämme überhaupt nicht.

Bei Kultivierung mit einer 0,5 %igen Neopeptonlösung ergab sich eine gewisse Tendenz zu pleomorphem Wachstum überhaupt förderten die meisten der Stickstoffquellen das pleomorphe Wachstum, jedoch meist nur bei Anwesenheit von

Glucose im Nährmedium. Die Autorin kam zu der Ansicht, daß starkes Mycelwachstum im allgemeinen ein notwendiger, aber nicht allein ausreichender Grund für das pleomorphe Wachstum von *Trichophyton mentagrophytes* ist. Sie konnte keine der von ihr untersuchten Kohlehydrate oder Stickstofflieferanten wie Pepton oder Neopepton als allein verantwortlich für das pleomorphe Wachstum der *Trichophyton*-stämme bezeichnen. Eine gewisse Förderung konnte sie auch durch Züchtung bei niedriger Temperatur beobachten.

2.2. Nährstoffbedarf der Dermatophyten

2.2.1. Wachstum auf natürlichen komplexen Medien

ROBERTS (zit. nach Nickerson) 1894 war der Erste, der mit Hilfe von menschlichen und tierischen Haaren *Trichophyton*-arten anzüchten konnte.

NANNIZZI (45) 1926 konnte bereits sehr gute Kulturen auf Haaren und Federn erhalten und vermutete, daß die von ihm kultivierten *Dermatomyces* in der Lage seien, Keratin zu hydrolisieren.

Die ersten Versuche, Kulturen von *Trichophyton*-arten und anderen humanpathogenen Keimen zu erhalten, wurden meist mit keratinhaltigem Material aus Haaren und Nägeln unternommen. WILLIAMS (78) unternahm Versuche mit keratinhaltigen Extrakten aus Haut und Nägeln. Ebenfalls erzielte er erste Resultate bei der Verwendung von Pepton als Kulturmedium.

ZIEGLER (83) berichtet über das hervorragende Wachstum

von Trichophyton mentagrophytes auf trypsinisiertem Nagelkeratin. Besonders Überraschend war die Entdeckung der enormen Keratinolyse von Trichophyton mentagrophytes. Es wurde mehr Keratin abgebaut als Mycel aufgebaut.

WILLIAMS (78) fand 1934, daß sich Trichophyton Schönleinii auf Haarmaterial züchten lasse, das zuvor mit Äther behandelt worden war. Viele der von ihm untersuchten Dermatophyten wuchsen auf diesem Material ebenso gut wie auf dem herkömmlichen Sabouraudmedium.

2.2.2. Stickstoffernährung der Dermatophyten

Bereits seit SABOURAUD (62) wurde Pepton als Stickstoffquelle bei der Ernährung von Dermatophyten verwandt. Pepton ist ein komplexes Medium, das nicht nur die verschiedenen anorganischen Bestandteile in unterschiedlichen Mengen enthält, sondern auch in wechselnden Mengen Aminosäuren und Proteinspaltprodukte, ganz abgesehen von verschiedenen Substanzen, deren Rolle bei Ernährung der pathogenen Keime in einem komplexen Medium wie Pepton nicht zu klären ist.

MOSHER, SAUNDERS, KINGERY und WILLIAMS (44) lieferten eine der ersten sorgfältigen Untersuchungen über den Stickstoffnährbedarf der Dermatophyten.

Diese Autoren fanden, daß Trichophyton mentagrophytes in einem Medium mit ausschließlich anorganischem Stickstoff nur schlecht wächst. Sie fanden, daß die Pilze in einem synthetischen Medium nur wachsen könnten, wenn sie mit Aminosäuren beliefert würden. Weiterhin konnten sie feststellen, daß Leucin eine für Trichophyton mentagrophytes

unentbehrliche Aminosäure sei. Außerdem nahmen sie an, daß die beiden Aminosäuren Asparagin und Threonin das Wachstum der Dermatophyten und speziell das von *Trichophyton mentagrophytes* entscheidend fördere.

Mit Hilfe von Farbttests kamen sie zu der Annahme, daß der Pilz in der Lage sei, die beiden Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin selbst zu synthetisieren. Sie verglichen Wachstum von Kulturen in einem Aminosäurenährmedium und das Wachstum von Kolonien in einer Kaseinhydrolysatlösung. Dabei fanden sie, daß sie mit einem Kaseinhydrolysat wesentlich besseres Wachstum erzielen konnten, als mit einem Aminosäuregemisch.

ROBBINS und MA (59) untersuchten 1945 erneut in einer ausgedehnten Versuchsreihe die Stickstoffernährung von *Trichophyton mentagrophytes*.

Sie konnten die Untersuchungen von MOSHER (44) et al. größtenteils bestätigen. Nach ihren Ergebnissen war der Pilz unfähig, anorganischen Stickstoff in Form von Ammoniumnitrat zu verwenden.

Der Pilz wuchs in einer Temperaturspanne von 11 bis 35 Grad Celsius. Die Untersuchungen wurden in Erlenmeyerkolben und in kleinen Röhrchen auf Agar vorgenommen. Die Ergebnisse wurden durch Angabe des Koloniedurchmessers und durch Angabe des Trockengewichts gemessen.

Die Zugabe von Pepton bewährte sich bei allen Temperaturen gleich gut. Die Versuche erfolgten bei einem pH-Wert von 4,5. Das Wachstum konnte allgemein durch eine Verschiebung des pH-Wertes bis auf 6,5 verbessert werden. Die Autoren beobachteten im Gegensatz zu MOSHER (44) et al. keine Essentialität irgendeiner Aminosäure. Leucin verbesserte zwar das Wachstum der Pilze speziell in den ersten Tagen des Wachstums, aber durch Entzug der Aminosäure

war kein Stillstand des Wachstums zu erreichen. Sie fanden außerdem, daß der Pilz in der Lage war, aus einer einzelnen Aminosäure wie zum Beispiel Asparagin, jede andere Aminosäure selbst aufzubauen. Am besten erwies sich das Wachstum mit den Aminosäuren Leucin, Isoleucin, Glutaminsäure, Tyrosin und Phenylalanin. Allerdings war das Wachstum mit 1 mg jeder dieser Aminosäuren immer noch schlechter als mit 0,25 mg natürlichen Kaseinhydrolysats, das sich als das geeignetste Nährmedium bei ihren Versuchen erwies. Sie führten dies auf die Tatsache zurück, daß es dem Dermatophyten leichter sei, aus den Proteinbruchstücken des Kaseinhydrolysats die für ihn wichtigen Proteine aufzubauen, als aus den einzelnen Aminosäuren.

Bei der getrennten Verwendung der Aminosäuren unterschied sich nur die Art des Wachstums sehr stark voneinander. Cystin zum Beispiel erzeugte ein sehr starkes Oberflächenwachstum, während sich die Aminosäuren Lysin, Methionin, Hydroxyprolin und Threonin in dieser Hinsicht als sehr unproduktiv erwiesen. Die Wirksamkeit der Aminosäuren verschob sich mit Andauer des Versuches. Nach Ablauf von 34 Tagen war Asparagin die wirksamste Aminosäure. Bei einer Mischung aus insgesamt 13 Aminosäuren erzielten die Autoren das gleiche Wachstum wie mit einer um siebenmal geringeren Menge Kaseinhydrolysat.

Weiterhin beobachteten sie eine sehr starke Hemmwirkung von Hydroxyprolin auf das Wachstum von *Trichophyton mentagrophytes*. Ebenfalls eine sehr starke Hemmung von *Trichophyton mentagrophytes* durch Hydroxyprolin berichten ARCHIBALD und REISS (2), ROBBINS und McVEIGH (60).

STOCKDALE (67) fand *Trichophyton mentagrophytes*-Stämme, die in der Lage waren, Nitratstickstoff als alleinige Stickstoffquelle auszunutzen. Was die Verwendung von Amino-

säuren weiter betrifft, so gibt es umfangreiche Untersuchungen von einigen Autoren. Die Essentialität von Histidin zum Beispiel für Trichophyton Megninii konnte von SILVA und BENHAM (65) bewiesen werden.

Genaue Analysen über die Verwertung der einzelnen Aminosäuren wurden von DROUHET (13) und MEINHOF (40) gegeben.

Für die Verwertung der einzelnen Aminosäuren durch Trichophytenarten stellte MEINHOF (40) folgende Tabelle zusammen:

(Tabelle ist gekürzt wiedergegeben)

	Trichophyton				
	T.m.var pers.	T.rubrum	T.tons.	T.schönl.	T.m. ⁺
Alanin	(+)	+	0	++	++
Arginin		++	++	++	++
Asparagin	(+)	+	+	0	++
Cystein	(+)	(+)	0	0	++
Glutamin		++	++	0	++
Glycin	+	(+)	0	+	+
Histidin	(+)	+	0	++	+
Hydroxiprolin		0	+	+	++
Threonin		0	+	+	++
Tryptophan		+	0	0	+
Serin		+	+++	+	+
Leucin		+	++	0	++
Isoleucin		++	+	0	++
Methionin	(+)	0	0	0	0
Tyrosin	(+)	++	++	0	++

⁺T.m.var.pers. = Trichophyton mentagrophytes var persicolor

T.tons. = Trichophyton tonsurans

T.m. = Trichophyton mentagrophytes

2.2.3. Kohlehydraternährung der Dermatophyten

Von ROBIN 1902 stammt eine der ersten Untersuchungen über die Verwendung von Zuckern bei der Züchtung von Dermatophyten. Er fand, daß Glucose von Trichophyton mentagrophytes mehr verwendet wird, als etwa Maltose oder Lactose beim Aufbau des Mycels. Während TATE (71) 1929 keine Wachstumssteigerung bei der Anwesenheit von Zuckern feststellen konnte.

GODDARD (21) andererseits konnte bei Trichophyton mentagrophytes eine hohe Effektivität bei der Verwertung von Glucose feststellen. Er stellte fest, daß der Pilz Glucose ebenso gut aufnimmt wie etwa Pepton. GODDARD verglich die Zunahme des Wachstums von Trichophyton mentagrophytes bei Verwendung von verschiedenen Zuckern. Maßstab war das Trockengewicht. Er fand, daß Trichophyton mentagrophytes, Glucose, Mannose und Fructose verwerten könne, nicht aber Lactose. Er stellte bei allen Kulturen eine von der Gegenwart von Zuckern unabhängige Zunahme des pH-Wertes fest. Er kam zu der Ansicht, daß die Zunahme des pH-Wertes von der Zugabe von Pepton abhängig sei. Er fand, daß Trichophyton mentagrophytes von allen untersuchten Dermatophyten derjenige sei, der Kohlenstoffquellen am besten verwerten könne.

RAUBITSCHKE (52) entdeckte, daß Trichophyton mentagrophytes aus der Luft Kohlendioxyd assimilieren könne. Dasselbe stellte er bei Trichophyton rubrum und Trichophyton tonsurans fest. Er versuchte Dermatophyten in einer anorganischen Salzlösung ohne jeden Zusatz wachsen zu lassen. Der Effekt war allerdings gering. Schließlich gab er Dextrose hinzu und erzielte damit sehr gutes Wachstum. Trotzdem stellte er fest, daß Trichophyton mentagrophytes im Ver-

gleich zu anderen Pilzkulturen in vergleichbaren Nährmedien ein eher langsames Wachstum aufweist.

Ebenfalls über die Verwertung von Glucose durch die Dermatophyten, speziell durch *Trichophyton mentagrophytes*, berichten HOPKINS und IWAMATO (25), TATE (71), LEWIS und HOPPER (36).

MEINHOF (40) konnte in einer umfangreichen Arbeit über den Nährstoffbedarf der Dermatophyten folgende Gesamtübersicht über den Einfluß verschiedener Zucker auf das Wachstum der *Trichophyton*-Gruppen geben.

Tab. 2: Zuckerverwertung durch *Trichophyton*-Arten
(mod. nach MEINHOF).

Zucker	Spezies	Trichophyton		
		mentagr.	tonsurans	quinckeanum
Pentosen	Ribose	0	0	0
	Arabinose	++	0	0
	Xylose		(+)	
Desoxyhexose	Rhamnose		0	
Hexosen	Glucose	++	++	++
	Fructose	++	++	++
	Galactose	++	++	++
	Mannose	++		
	Sorbose			
Disaccharide	Saccharose	+		
	Maltose	++		
	Cellobiose			
	Lactose			
	Melibiose			

Die Hexosen erwiesen sich hier als die besten Kohlenstofflieferanten für die *Trichophyton*-Gruppe, speziell für *Trichophyton mentagrophytes*.

2.2.4. Der Bedarf der Dermatophyten an Mineralstoffen

MOSHER (44) et al. 1936 prüften in einer grundlegenden Arbeit über den Nährstoffbedarf der Dermatophyten auch die Frage, inwieweit das Wachstum dieser Pilze von Spurenelementen bzw. von Mineralien im allgemeinen abhängig ist. Ihrer Ansicht nach konnte das Stickstoffbedürfnis des Pilzes durch Ammoniumnitrat nicht befriedigt werden, aber andererseits erschien ihnen das Ammoniumion für das Wachstum unerlässlich zu sein. Sie kamen zu dem Ergebnis, daß außer dem Ammoniumion in größerem Umfange noch Kalium, Magnesium und Calcium gebraucht würden. Sie benutzten folgendes Grundnährmedium:

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3,00g	FeCl_3	0,10mg	KI	0,10mg
KH_2PO_4	4,00g	ZnSO_4	1,00mg	ThCl_3	0,10mg
$\text{CaCl}_2\text{H}_2\text{O}$	0,10g	MnCl_2	1,00mg	H_3BO_3	1,00mg
MgSO_4	0,25g	CuSO_4	0,10mg		

Bei Anwesenheit aller dieser Bestandteile in der Nährlösung stellten sie gutes Wachstum fest. Wurden Eisenchlorid, Kupfersulfat, Manganchlorid oder Kaliumdihydrogenphosphat weggelassen, so wurde das Mycelwachstum eingeschränkt.

Eines der wenigen Metallionen, für das ein wachstumsfördernder Einfluß auf Dermatophyten bewiesen wurde, ist das Magnesiumion, von dem GÖTZ und ARONIS (23) nachwiesen, daß es eine wachstumsfördernde Wirkung auf Dermatophyten hat. Außerdem konnten ENGLISH und BARNIARD (14) Stämme von *Trichophyton mentagrophytes* feststellen, die in ihrem Wachstum auf das Vorhandensein von Mangan, Zink und Eisenionen angewiesen waren. Ein optimales Wachstum

wurde von POLAKIS und BARTLEY (50) bei Verwendung einer Spurenstofflösung beobachtet, die alle wichtigen Metallionen beinhalten.

2.2.5. Einfluß von Vitaminen auf das Wachstum von Dermatophyten

MOSHER (44) et al. entdeckten bei einem Stamm von *Trichophyton mentagrophytes* eine offensichtliche Förderung des Wachstums durch Riboflavin, während ROBBINS und MA (59) den gleichen Effekt bei *Trichophyton dicoides* feststellten.

Bisher gibt es in der Literatur nur wenige Berichte, daß ein Vitamin für das Wachstum eines *Trichophyton*-stammes essentiell wäre. Die meisten Vitamine fördern das Wachstum mehr oder weniger stark, wie dies KADEN (30), GEORG (20) und MOSHER (44) et al. berichten.

GEORG (19) entdeckte, daß *Trichophyton equinum* von Nicotinsäureamid abhängig ist.

Er berichtet auch daß *Trichophyton verrucosum*-Stämme fast immer von Thiamin oder von Thiamin + Inositol abhängig sind.

2.2.6. Einfluß von Phytohormonen auf das Wachstum von Dermatophyten

Eine der grundlegendsten Untersuchungen über die Einwirkungen von Phytohormonen auf Pilze wurde von BOUILLENE und BOUILLENE-WALRAND (7) durchgeführt. Sie studierten das Verhalten der Dermatophyten gegenüber den Auxinen und Herbiziden. Sie stellten fast ausnahmslos eine mehr oder

weniger starke Hemmwirkung auf die von ihnen untersuchten Pilze fest, die hauptsächlich durch Veränderung des pH-Wertes beeinflusst werden konnte.

POPOFF, IVANOFF (51) et al. testeten alpha-Naphtalinessigsäure an *Trichophyton mentagrophytes*, konnten aber keinerlei Effekt feststellen.

ESTEL (15) kam in seiner Dissertation zu dem Ergebnis, daß *Trichophyton mentagrophytes* in einer Kultur, der Gibberellinsäure zugesetzt war, eine zwanzig bis vierzig prozentige Wachstumsbeschleunigung erfuhr. Er testete die Pilze sowohl auf Kimmig- als auch auf Spezialagar aus. Nicht klären konnte er allerdings, ob das Kaliumsalz oder Gibberellinsäure einen nur unspezifischen Wachstumsreiz auf den Pilz ausübte, oder ob es sich bei der Wirkung des Gibberellins um eine hormonartige Wirkung handelte. Die von ihm angewandte Dosierung der Gibberellinsäure hatte zwar hormonartigen Charakter, nämlich 10^{-6} Mol, aber ob die Wirkung proportional der Konzentration ist, konnte von ihm nicht fest gestellt werden.

2.3 Einfluß des pH-Wertes und der Temperatur auf das Wachstum der Pilze

NICKERSON und WILLIAMS (47), sowie ROBBINS und MA (59) haben darüber eingehende Untersuchungen vorgenommen. Sie testeten *Trichophyton mentagrophytes* in drei verschiedenen Nährmedien:

Einmal in einem Basalmedium (nur Mineralstoffe), zum anderen in Basalmedium plus 1mg Kaseinhydrolysat und schließlich in einem Basalmedium plus 25 mg Pepton. Dabei variierten sie den Ausgangs-pH-Wert von 4,5 bis 6,4 und fanden bei zunehmend alkalisch werdendem Medium eine

steigende Ausbeute an Mycel. Sie fanden, daß es möglich war, den pH-Wert bis auf 10,5 zu erhöhen, ohne daß eine merkliche Veränderung des Wachstums eingetreten wäre.

LEISE und JAMES (35) stellten fest, daß Trichophyton mentagrophytes am besten in alkalischem Milieu wächst, besonders bei Gegenwart eines optimalen Nährmediums. Eine genaue Angabe darüber, in welchem pH-Bereich die Dermatophyten überhaupt lebensfähig sind, konnte nicht gemacht werden.

MOSHER (44) et al. bemerkten, daß sich durch die Produktion von Stoffwechselprodukten während des Wachstums von Trichophyton mentagrophytes auf Sabouraud-Agar der pH-Wert des Agars von 5,5 nach 8,0 verschob.

ROBBINS und MA (59) konnten nur eine sehr geringfügige Zunahme des pH-Wertes während eines eintägigen Wachstums von Trichophyton mentagrophytes feststellen. Sie sahen eine stärkere Verschiebung des pH-Wertes vor allem bei älteren Kulturen, da bei diesen nach Verbrauch der Nährsubstanzen aus dem Medium der puffernde Effekt wegfällt.

RIETH und REFAI (54) berichten in ihrer Arbeit ebenfalls, daß Trichophyton- und Microsporonstämme den pH-Wert der Nährlösungen verschieben.

Trichophyton mentagrophytes verschob in einer Glucoselösung den pH-Wert von 6,4 auf 7,7 und in einer Peptonlösung von 6,4 auf 8,8, wobei sie noch einen grundsätzlichen Unterschied zwischen submers und an der Oberfläche wachsenden Dermatophyten sahen. Die an der Oberfläche wachsenden Pilze alkalisierten den Nährboden etwas weniger stark.

2.4. Verhalten der Dermatophyten bei unterschiedlichen Temperaturen

Das Verhalten der Dermatophyten bei verschiedenen Temperaturen untersuchten NICKERSON und WILLIAMS (47). Sie fanden gutes Wachstum der Pilze in vitro bei Temperaturen zwischen 25 und 38 Grad Celsius. Sie beobachteten, daß viele Arten von Dermatophyten bei höheren Temperaturen die Tendenz zur Austrocknung und zu einer wesentlich geringeren Wachstumsrate zeigten, wie bei niedrigeren Temperaturen.

Bereits VERUJSKY (75) 1887 beobachtete diese Tendenz, und die Tatsache, daß mit zunehmender Temperatur die Fähigkeit der Pilze zur Sporulation abnahm.

BONAR und DREYER (5) setzten Trichophyton mentagrophytes verschiedenen, zum Teil extremen Temperaturen, aus und prüften hinterher die Keimfähigkeit des Mycels. Trichophyton mentagrophytes zeigte die Fähigkeit, selbst Temperaturen von 65 Grad Celsius zu überstehen ohne die Keimfähigkeit zu verlieren.

WEIDMAN (78) fand ebenfalls, daß Trichophyton mentagrophytes einer der hitzebeständigsten Pilze sei.

Genaue Angaben über eine optimale Temperatur für das Wachstum von Trichophyton mentagrophytes finden sich in der Literatur allerdings nicht.

2.5. Die Enzyme der Dermatophyten

Die ersten Untersuchungen über die Ektoenzyme der Dermatophyten führte TATE (71) durch. Er konnte verschiedene Enzyme der Dermatophyten identifizieren. Er fand in den von ihm untersuchten Dermatophyten ein proteolytisches

Ferment, das mit seinem pH-Optimum im alkalischen Bereich war. In den von ihm untersuchten Trichophytonarten konnte er Diastase und Maltase feststellen. Ebenfalls Lipase und Urease, Peroxidase, Katalase, Tyrosinase, Amylase, außer bei Trichophyton tonsurans.

Die älteste Untersuchung über die Enzyme der Dermatophyten stammt von MacFAYDEN (zit. nach Nickerson). Er entdeckte 1894 bei Trichophyton tonsurans ein Ferment, das Gelatine verflüssigte und sowohl im alkalisch als auch im sauren Milieu aktiv war.

Die Enzyme Asparaginase und Aminosäureoxidase wurden von BENTLEY (3) bei Trichophyton mentagrophytes und bei Trichophyton rubrum entdeckt.

CHATTAWAY, THOMPSON und BARLOW (9) kamen bereits zu einer teilweise quantitativen Aussage. Sie stellten in Schüttelkulturen, die in Sabourauds Agar (unter Weglassung des Agar-Agarzusatzes) bei Zimmertemperatur wuchsen, erhebliche Enzymaktivitäten fest. Sie führten mit Hilfe eines Mycelextraktes eine Oxidation verschiedener Substrate durch und zwar von Glucose, Pyruvat, Succinat, Acetat und Fumarat. Dabei konnten sie folgende Einzelenzyme identifizieren: Aminosäureoxidase, Diastase und alkalische Phosphatase.

RIPPON und VARADI (56) berichten über Elastaseaktivität von Trichophyton mentagrophytes und Actinomycetes.

SEN (64) stellte Amylaseaktivität bei Trichophyton mentagrophytes und Trichophyton tonsurans fest.

Qualitative Enzymnachweise wurden in neuerer Zeit vor allem mittels enzymchemischer Methoden durchgeführt.

MEINHOF, BRAUN-FALCO und THIANPRASIT (43) führten eingehende Untersuchungen über den histochemischen Enzymnachweis in hautpathogenen Keimen durch.

MEINHOF stellte bei *Trichophyton mentagrophytes* Leucin-aminopeptidase, alkalische Phosphatase, saure Phosphatase fest. Er konnte bei diesen Versuchen eine weitgehende Abhängigkeit der Enzymaktivität von dem Peptongehalt des Nährmediums beobachten. Die Ektoenzyme der Dermatophyten konnten mit Hilfe der histochemischen Nachweismethode allerdings nicht erfaßt werden.

Ebenfalls umfassende Studien stammen von ZIEGLER (82) über die Ektoenzyme der Dermatophyten.

ZIEGLER untersuchte die proteolytischen Fähigkeiten der Dermatophyten mit viskosimetrischen Verfahren anhand der Gelatinverflüssigung durch Dermatophyten.

Untersuchungen gleicher Arten liegen von HOPKINS und IWAMATO und AHEARN, MEYERS und NICHOLS (1) vor.

ZIEGLER (84) führte nicht nur qualitative, sondern auch quantitative Untersuchungen über die Enzymkinetik der Dermatophyten durch. Für seine Untersuchungen verwandte er eine Standardnährlösung, die er nach Angaben von MOSHER, SAUNDERS, KINGERY und WILLIAMS (44) modifizierte, und die aus einer Minerallösung plus Vitaminzusätzen und Glucose mit den Aminosäuren Glutaminsäure, Histidin, Methionin, Tryptophan, bestand.

Er fand folgende Enzyme vor allem bei *Trichophyton mentagrophytes* und bei *Microsporum canis*:

Amylase, Pektinase, Lipase, Keratinase, Phosphatase und Proteinasen. Proteinasen wurden obligat von Dermatophyten ausgeschieden. Das Wirkungsoptimum der Proteinase lag bei einem pH-Wert von 5,4 bis 6,9. Dies führte ihn zu der Annahme, daß es sich hier um einen Proteinasekomplex handeln müsse.

In ähnlicher Weise konnten CHATTAWAY (8) et al. einen Peptidasenkomplex mit einem Wirkungsoptimum zwischen einem pH-Wert von 5 und 9 aus dem Mycel verschiedener Dermatomyceten isolieren. Außerdem führte ZIEGLER (82) Hemmungsversuche der Proteinase u.a. mit Natriumfluorid, Kupfersulfat, Sublimat, 8-Oxychinolin und spezifischen Sulphydrilblockern wie zum Beispiel mit p-Chlor-Mercuribenzoessäurenatrium durch.

Letzterem gegenüber fand er eine hohe Empfindlichkeit der Proteinasen.

Ebenfalls obligat bei Trichophyton mentagrophytes fand er eine Phosphatase. Das Wirkungsoptimum lag bei einem pH-Wert von 8,7.

Keratinase war ein eigenständiges Enzym, das die Keratine für Proteinasen erst angreifbar macht.

Von großer Bedeutung waren seine Versuche vor allem für die Mykotherapie. Da die Hemmung der Dermatophyten ja immer in ihrer parasitischen Phase erfolgt, ist die Hemmung der die Eiweiße und Lipide aufschließenden Ektoenzyme entscheidend.

DORN (12) konnte in seiner Arbeit nicht nur über die Isolation zweier alkalischer Phosphatasen berichten, es gelang ihm auch, die Molekulargröße der Enzyme und die Aktivität bei verschiedenen pH-Werten gegenüber p-Nitrophenylphosphat zu messen. Die Aktivität beider Enzyme nahm linear zum Steigen des pH-Wertes zu. Außerdem hatte keines der beiden Enzyme eine auch nur geringfügig erkennbare Aktivität bei pH-Werten unter 5,5.

Dies mag sicher auch der Grund dafür sein, daß in älteren Untersuchungen über die Dermatophyten, die meist bei niedrigen pH-Werten durchgeführt wurden, keinerlei Enzymaktivitäten festgestellt werden konnten.

HOPKINS und IWAMATO (25) stellten ebenso wie ZIEGLER (81) hohe proteolytische Enzymaktivitäten bei Trichophyten mentagrophytes fest.

Zum quantitativen Nachweis von proteolytischen Enzymen von Dermatophyten leisteten NELSON, CIACCIO und HESSE (46) mit ihrer Bestimmungsmethode einen entscheidenden Beitrag. (Näheres wird in einem späteren Abschnitt berichtet.) (Seite 32)

2.6. Wachstumskinetik der Dermatophyten

Die bisher beschriebenen Untersuchungen der verschiedenen Autoren erfolgten in der Regel auf Agarnährböden oder in Flüssigkulturen, ohne daß die Möglichkeit bestanden hatte, Angaben über den genauen Ablauf des Wachstums zu machen. Sie konnten wohl die Endergebnisse der jeweiligen Versuche angeben, wie es zum Beispiel ZIEGLER (85) mit seinen Hemmungsanalysen über Dermatophyten vermochte, aber es war nicht möglich, den Wachstumsablauf zu beschreiben.

TRINCI (74) beschrieb in einer Arbeit über die Wachstumskinetik von *Aspergillus nidulans* und Dermatophyten das Verhältnis des zeitlichen Wachstumsablaufs zur Konzentration der verschiedenen Nährstoffe. So untersuchte er die Auswirkungen von Sauerstoffpartialdruck, Glucosekonzentration und Temperatur auf die Wachstumskurve der Dermatophyten.

Er fand folgende Ergebnisse: die radiale Wachstumsrate nahm linear mit dem Logarithmus der anfänglichen Glucosekonzentration zu.

Wenn Pilze in einem optimalen Medium ohne Vorhandensein von Wachstumsinhibitoren wachsen, dann folgt ihre Ent-

wicklung exponentiell der Gleichung: $dm/dt = a M$, wobei a die spezifische Wachstumsrate und M die Masse der Kultur ist.

Integration ergibt $\ln M - \ln M_0 = at$, wobei M_0 die Konzentration des Materials zur Zeit 0 ist. Die spezifische Wachstumsrate ist somit ein direktes Maß für das Wachstum eines Organismus und kann folgendermaßen ausgedrückt werden: $a = \ln 2/t_d$, wobei t_d die effektive Wachstumszeit ist.

Untersuchungen hierüber wurden ebenfalls in einem Medium vorgenommen, das als Ausgangsmaterial ein anorganisches Basalmedium zur Grundlage hatte.

TRINCI (74) fand für die submers wachsenden Kulturen ähnlich wie für die einzelligen Mikroorganismen, eine lag-Phase, d.h. die Zeit von Inokulation bis zum Wachstumsbeginn der Kulturen, eine exponentielle Phase oder log-Phase, eine stationäre Phase und eine autolytische Phase.

2.7. Allgemeine Bemerkungen zur Wachstumskinetik von Mikroorganismen

Da auf der protophytischen Organisationsstufe die einzelnen Individuen meist direkt durch einfache oder multiple Teilungen aus dem Mutterorganismus hervorgehen und die formativen Vorgänge etwas in den Hintergrund treten, lassen sich an ihnen besonders gut Phasen des Wachstums bzw. der gesamte Wachstumsverlauf studieren. Überträgt man Mikroorganismen in ein für sie geeignetes Medium, so beginnt nach einer kurzen Anlaufphase, in der die Zellen keine Vermehrung, sondern lediglich eine Größenzunahme zeigen, das Zellteilungswachstum. Seine Geschwindigkeit nimmt im ersten Abschnitt, der Beschleu-

nigungsphase solange zu, bis eine konstante Geschwindigkeit erreicht wird.

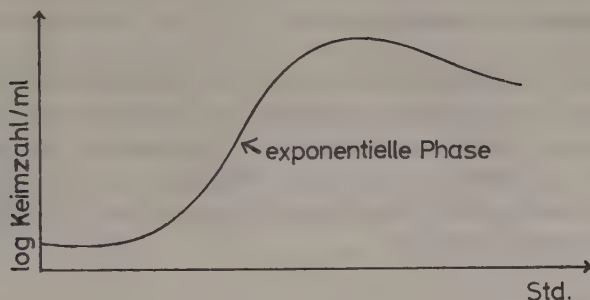


Abb. Nr. 1 Wachstumsverlauf von Mikroorganismen

Bestimmt man nun in der einsetzenden nächsten Phase die Anzahl der Zellen bzw. das Gesamtgewicht, so erhält man die logarithmische Wachstumsphase. In ihr zeigt das Wachstum einen exponentiellen Verlauf, d.h. es entstehen a. 2^n Zellen, hierauf folgt eine kurze Verzögerungsphase, dann die stationäre Phase und schließlich die autolytische Phase, in welcher der Gesamtgehalt der gewachsenen Organismen infolge Autolyse wieder verringert wird.

Von BURKHOLDER und SINNOT (6) stammen einige interessante Beobachtungen über das grob makroskopische Verhalten von Pilzkolonien in geschüttelten oder gerührten flüssigen Kulturen. Während in nicht geschüttelten Kulturen erfahrungsgemäß die Kolonien in einem dichten Rasen wachsen, entwickeln sich laut BURKHOLDER und SINNOT in gerührten Kulturen die Einzelkolonien in Form von kleinen Klümpchen. Sie führten diese Untersuchungen an verschiedenen Pilzarten, insgesamt an 150 Stämmen, durch

und konnten dabei sehen, daß die Ausbildung der Klümpchen, ihre Form und Größe von der Zusammensetzung der Nährlösung, der Höhe der Temperatur und der Geschwindigkeit der Rührlösung, abhängig war.

Derartige von den beiden Autoren beschriebene Kulturen eignen sich allerdings nur sehr wenig zur Untersuchung des genauen Wachstumsablaufs von Dermatophyten, da das Wachstum in diesen Kulturen zu inhomogen ist, um eine genaue Aussage über die Kinetik des Wachstums des Einzelorganismus zu geben.

RIGHELATO und PIRT (55) berichten als Erste, daß es ihnen gelungen war, mit Hilfe eines Chemostats eine vollkommen homogene Kultur von *Penicillium chrysogenum* zu erhalten, d.h., innerhalb der Kultur waren sämtliche Einzelorganismen im gleichen Stadium des Wachstums. Mit derartigen Versuchsanordnungen lassen sich natürlich wesentlich differenziertere Aussagen zur Wachstumskinetik von Pilzen machen, als dies mit jeder anderen Untersuchung möglich wäre.

Eine ähnliche Möglichkeit nutzten DORN und RIVERA (12) bei ihrer Untersuchung über die Wachstumskinetik des *Aspergillus nidulans*.

Sie verwendeten als Erste einen Microferm Tischfermentor der Brunswick Sci. Company, mit dessen Hilfe sie eine Suspension von *Aspergillus nidulans* herstellten und dabei über eine Zeitdauer von 40 Stunden den Wachstumsverlauf des Pilzes anhand von folgenden Parametern studierten:

Veränderung des Trockengewichts, Abnahme des anorganischen Phosphorgehaltes im Medium, Veränderung des Protein-

gehaltenes, Veränderung des pH-Wertes und Anstieg der alkalischen und sauren Phosphatase im Medium.

DORN und RIVERA (12) stellten dabei die ausgezeichneten Verwendungsmöglichkeiten des New Brunswick Fermentors für Untersuchungen zur Wachstumskinetik an Mikroorganismen im allgemeinen fest. Mit Hilfe des Fermentors war es ihnen möglich, den Wachstumsablauf der von ihnen untersuchten Spezies kontinuierlich über einen längeren Zeitraum zu untersuchen. Ihre Versuche liefen über einen Zeitraum von 50 Stunden. Dabei stellten sie fest, daß die Änderung des Proteingehaltes, der alkalischen und sauren Phosphatase einen steilen exponentiellen Verlauf zeigten.

3. Fragestellung der vorliegenden Untersuchung

Bisherige Untersuchungen über Dermatophyten wurden meist nur auf festen Nährböden oder in flüssigen Standkulturen durchgeführt. Es gibt bis jetzt nur wenige Publikationen über Schüttelkulturen. Die Untersuchung in einem Fermentor der New Brunswick Scientific Company erlaubt

- a) eine genaue Kontrolle der Auswirkung von Temperaturveränderungen, von Änderungen der Rotationsgeschwindigkeit des Rührwerks, sowie gegebenenfalls der Zufuhr verschiedener Gase,
- b) Anzüchtung von größeren Mengen frischen Pilzmaterials in relativ kurzer Zeit,
- c) Verlaufsuntersuchungen von pH-Wert, Enzymgehalt, Eiweißgehalt, sowie von Veränderungen der Zusammensetzung des Nährmediums.

Der praktische Wert der Arbeit ist darin zu sehen, daß es mit Hilfe des Fermentors und definierter optimaler Wachstumsbedingungen möglich sein sollte, in kurzer Zeit größere Mengen frischen Pilzmycels zu gewinnen, das für biochemische und immunologische (Antigenherstellung) Forschungen benötigt wird.

4. Material und Methodik

4.1. Verwendete Testorganismen

Die Versuche wurden mit *Trichophyton mentagrophytes* (Stamm Nr. 4182 Marburg) und *Candida albicans* durchgeführt. Beide Stämme wurden auf Kimmigagarplatten angezüchtet. Nach Bildung eines dichten Mycelrasens auf den Platten wurde mittels einer ausgeglühten Platinöse auf weitere Platten überimpft, bzw. das Mycel als Ausgangsmaterial in einer Menge von 3,0 g Frischgewicht abgehoben.

4.2. Verwendete Nährmedien und Zusätze

1. Kimmigagar zum Anzüchten auf Platten
2. Kimmignährlösung als komplexes Medium für Fermentorversuche
3. Synthetische Nährmedien
Basislösung nach POLAKIS und BARTLEY (50)
Spurenstofflösung nach POLAKIS und BARTLEY
Vitaminlösung nach POLAKIS und BARTLEY
4. Zusätze von

Glucose	3%	und	KH_2PO_4	1,8%
Glucose	1,5%		KH_2PO_4	0,9%
5. Zusatz von jeweils 1 %
L-Lysin, dL-Leucin, Isoleucin, L-Tyrosin, dL-Valin,
dL-Glycin, dL-Methionin, Glutaminsäure, dL-Serin,
L-Phenylalanin, L-Tryptophan, Histidin, Asparaginsäure, dL-Threonin, Cystein, Cystin, Glutamin und Prolin.
6. Natriumsalz der Giberellinsäure
7. Als Antibiotikazusätze:
Colistin
Gentamycin
Novobiocin

Zu 4.2.1. und 4.2.2:

Zusammensetzung des Kimmigagars und der Kimmignährlösung:

Glucose	10,0 g
Pepton	5,0 g
Natriumchlorid	5,0 g
Standard-II-nährboullion MERCK	5,0 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

Beim Kimmigagar kamen noch 18,0 g Agar-Agar hinzu.

Zu 4.2.3:

Zusammensetzung der Basislösung, der Spurenstofflösung und der Vitaminlösung nach POLAKIS und BARTLEY (50):

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	6,0 g	Spurenstofflösung:	
MgSO_4	1,0 g	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	4,0 g
CaCl_2	0,3 g	$\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	4,0 g
NaCl	0,1 g	$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	1,0 g
$\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,02 g	KJ	1,0 g
Aqua dest.	ad 1000 ml	H_3BO_3	1,0 g
		$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2,0 g
		$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,4 g
		Aqua dest.	ad 1000ml

Vitaminlösung:

p-Aminobenzoessäure	1,75 g
Biotin	0,18 g
Inositol	43,20 g
Nicotinsäureamid	10,00 g
Calciumpanthothenat	3,50 g
Pyridoxin HCl	0,65 g
Riboflavin	0,40 g
Thiamin HCl	9,00 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

4.3. Verwendung des Microferm-Tischfermentors der New Brunswick Sci. Company

Mit diesem Gerät lassen sich exakte Untersuchungen über längere Zeiträume (Tage) durchführen. Das Gerät wird elektronisch gesteuert und erlaubt die Einstellung konstanter Temperaturbedingungen, sowie Durchfluten der inkubierten Kultur mit genau definierten Mengen von Gasen. Außerdem taucht in den 2-Liter-Glasbehälter des Fermentors ein Rührwerk ein, dessen Geschwindigkeit zwischen 50 und 1000 U/min variiert werden kann. Dem 2-Liter-Glasbehälter können durch eine verschraubbare Öffnung auch bei Betrieb des Gerätes Zusätze eingegeben oder Proben entnommen werden. Zur Kontrolle des Wachstumsverlaufes der inkubierten Kulturen entnehmen wir in mehrstündigen Abständen Proben von 10,0 ml, die entweder sofort verarbeitet oder bei minus 24 Grad Celsius eingefroren wurden.



Abb. Nr. 2
Ansicht des
Fermentors

Man kann das Gerät auch mit einem elektronisch gesteuerten Antischaumgerät kombinieren, um bei höheren Umdrehungszahlen des Rührwerks eine zu starke Schaumbildung zu vermeiden.

4.4. Herstellung von Suspensionen mit dem Ultrathurrax-Homogenisator.

Mit diesem Gerät gelang die Herstellung einer vollkommen homogenen Suspension von Trichophyton mentagrophytes. In dieser Suspension waren nur noch Mikrokonidien vorhanden, die noch nicht ausgekeimt waren. Der Ultrathurrax-Homogenisator besteht im Wesentlichen aus einem kleinen rotierenden Messer am Ende eines Stabes, das bis zu 60 000 U/min. rotiert.

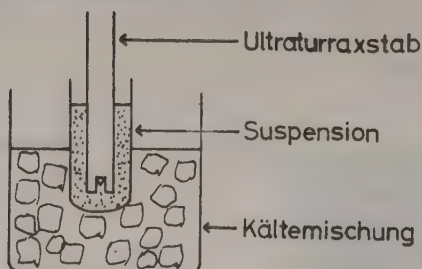


Abb. Nr. 3
Schema der Herstellung einer Suspension

Abb. Nr. 3 Schema der Herstellung einer Suspension
Der Homogenisator taucht nun in ein Zentrifugenglas mit der zu zerkleinernden Suspension. Man lässt ihn genau 30 Sekunden mit einer Umdrehungszahl von 20 000 pro Minute laufen. Um bei einer solch hohen Umdrehungszahl eine zu starke Erhitzung der Suspension und damit ein Abtöten des Mycels zu verhindern, umgaben wir das Zentrifugenglas mit einer Kältemischung aus Eis und Kochsalz. Der Ultra-

thurraxstab und das Zentrifugenglas, sowie die verwendeten 10 ml Nährlösung wurden vorher sterilisiert und sodann 0,5 g Mycel (Frischgewicht) steril von einer Kimmigagarplatte in die Nährlösung überimpft. Die Werte von 30 Sekunden und 20 000 Umdrehungen pro Minute stellten wir als optimal fest. Bei Unter- oder Überschreiten dieser Werte waren entweder noch zuviele Mycelstücke vorhanden, oder das Mycel war bereits vollständig zerfetzt.

Da nur noch Mikrokonidien vorhanden waren, konnte nun auch exakt der Beginn der Wachstumsphase bestimmt werden.

4.5. Kontrollmethoden des Wachstumsverlaufs

1. Bestimmung des Frischgewichts des Mycels
2. Bestimmung des Trockengewichts des Mycels
3. Bestimmung des Gesamteiweißgehalts in der Lösung
4. Bestimmung der Proteinaseaktivität in der Lösung
5. Bestimmung der Änderung des pH-Wertes der Nährlösung

Zu 4.5.1:

Eine 10 ml-Probe wurde zentrifugiert, der Überstand abgossen, der Rückstand mit Aqua dest. aufgenommen und gerührt. Dieser Waschvorgang wurde zweimal wiederholt, um eventuelle Rückstände der Nährlösung zu entfernen. Anschließend wurde die Probe gewogen.

Zu 4.5.2:

Methode der Trockengewichtsbestimmung nach DORN und RIVERA (12).

Eine 10ml-Probe wurde durch ein 24 Stunden lang bei 90 Grad Celsius getrocknetes und dann gewogenes Filterpapier

filtriert und zweimal mit Aqua dest. gewaschen. Nach Trocknung über 24 Stunden wurden Filterpapier und Rückstand gewogen. Das Trockengewicht ergab sich nach Abzug des Filterpapiergewichts.

Zu 4.5.3:

Der Eiweißgehalt wurde mit einer modifizierten Biuretmethode bestimmt. Wir versetzten 5 ml Probe mit 5 ml Biuretreagens und ließen es 30 Minuten bei Zimmertemperatur reagieren. Kontrolle war ein Leerwert aus 5,0 ml 0,9%ige Natriumchloridlösung und 5 ml Biuret. Standardwert war 0,1 ml Lab-Trol (KALI-CHEMIE) und 4,9 ml Natriumchloridlösung 0,9 %, plus 5 ml Biuret-Reagenz. Nach 30 Minuten Reaktionsdauer Messung der Extinction mit dem Eppendorffphotometer.

Die Berechnung des Eiweißgehaltes einer Probe ging folgendermaßen vor sich:

Da 100 ml Lab-Trol genormt 7,05 g Eiweiß enthalten, waren also in einem Standardwert 7,05 g Eiweiß. Daraus läßt sich folgende Formel aufstellen:

$$\frac{\text{Extinction der Analyse mal } 7,05}{\text{Extinction des Standardwertes mal } -5} = \text{mg Protein pro ml.}$$

Zu 4.5.4:

Die Bestimmung der Proteinase-Aktivitäten erfolgte nach einer Methode von NELSON, CIACCIO und HESSE (46). Als Substrat wurden zwei Farbstoffe der CALBIOCHEM LOS ANGELES verwendet, nämlich CONGOCOLL und AZOCOLL, zwei organische Azofarbstoffe. Es sind dies unlösliche aber hydrophile Farbstoff - Proteinkomplexverbindungen. Durch die von den Dermatophyten abgeschiedenen Enzyme wird der Protein-Farbstoffkomplex gespalten und der Farbstoff geht

in Lösung. Die Rate des abgetrennten Farbstoffes gibt also die Größe der Enzymaktivität wieder. Die Reaktion lief bei Zimmertemperatur und einem pH-Wert von 7,5 ab.

Eine 10ml-Probe wurde 10 Minuten lang bei 3000 U/min. zentrifugiert, und zwei Milliliter des Überstands mit 3 ml eines Phosphatpuffers nach SORESENSEN auf einen pH-Wert von 7,5 eingestellt. Eine Probe wurde nun mit 10mg AZOCOLL-Farbstoff und eine weitere mit 10 mg CONGO-COLL versetzt, und in einem Magnetrührer 1 Stunde lang gerührt, und der verbliebene nicht gelöste Farbstoff abzentrifugiert. Anschließend wurde die Extinction der Lösung im Eppendorffphotometer gemessen. Die Extinction der Reaktion mit CONGOCOLL maßen wir mit einem Filter von 492 nm und bei AZOCOLL mit einem Filter von 578 nm. Als Kontrollwert lief eine Probe mit, bestehend aus 2 ml 0,9%iger Natriumchloridlösung, 3 ml Puffer nach SORESENSEN und jeweils 1mg CONGOCOLL und AZOCOLL.

Als Standardwert gilt folgende Beziehung:

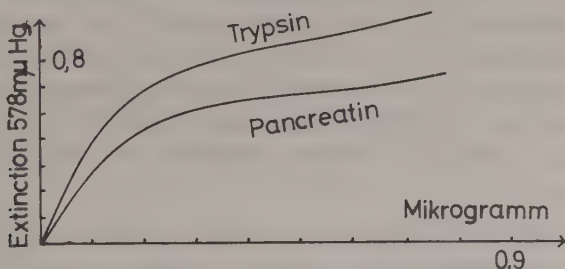


Abb. Nr. 4

Eine zweite Extinctionsmessung erfolgte nach einer weiteren Rührzeit von zwei Stunden, um soviel Substrat wie möglich mit dem Farbstoff reagieren zu lassen.

Zu 4.5.5:

Zur Bestimmung des jeweiligen pH-Wertes wurde Indikatorpapier MERCK verwendet.

5. Eigene Ergebnisse

5.1. Vorversuche mit antibiotischen Zusätzen zur Sicherung eines sterilen Versuchsablaufs

Die zu testenden Organismen befanden sich im Fermentor in einem geschlossenen Glasbehälter aus dem in mehrstündigen Abständen durch eine verschraubbare Öffnung die Proben entnommen wurden, und durch die auch der Fermentor mit Ausgangsmaterial beschickt wurde.

Der Glasbehälter des Fermentors wurde einschließlich des Rührwerks und des Kühlsystems an drei aufeinanderfolgenden Tagen jeweils eine halbe Stunde lang in einem Dampftopf sterilisiert. Ebenso verfahren wir mit sämtlichen verwendeten Nährlösungen. Es war nicht möglich, die Kulturen keimfrei zu halten, da man nicht vermeiden konnte, daß beim Entnehmen der Proben und bei der Herstellung der Ausgangssuspension Bakterien hinzu kamen. Deshalb verwandten wir, wie von HANTSCHKE (24) und TAPLIN (70) angegeben, die Antibiotika Novobiocin, Colistin und Gentamycin. Bei den von ihnen angegebenen Konzentrationen stellten wir allerdings fest, daß das Wachstum der Testorganismen in komplexem Nährmedium erheblich gehemmt wurde.

In komplexem Nährmedium hemmte Colistin das Wachstum in einer Konzentration von 80 mcg pro ml und Novobiocin in einer Konzentration von 100 mcg pro ml, während Colistin in einer Konzentration von 60 mcg pro ml und Novobiocin in einer Konzentration von 75 mcg pro ml nicht mehr hemmten. Andererseits war die Konzentration ausreichend, um Bakterienwachstum zu verhindern. Gentamycin war in der angegebenen Konzentration von 40 mcg pro ml in seiner Wirkung optimal. Den besten antibiotischen Schutz bei Ver-

wendung von Kimmignährlösung konnten wir durch eine Kombination von Colistin und Gentamycin in den angegebenen Konzentrationen erreichen.

Die Anwendung der Antibiotika bei den verschiedenen synthetischen Nährmedien war etwas problematischer. Nach Zugabe von Novobiocin und Colistin zu den verschiedenen Nährlösungen war stets eine weiße Ausfällung zu sehen, die ein Weiterwachsen der Kultur unmöglich machte. Die Zugabe von Gentamycin verlief stets komplikationslos. Die Austestung der Verträglichkeit der einzelnen Aminosäuren mit Novobiocin und Colistin ergab folgendes Bild:

mit Novobiocin	pH5	pH2	pH7,5	pH5	pH7	mit Colistin
Methionin	+	+	o	o	+	
Histidin	+	+	o	o	+	
Tyrösin	+	+	o	o	+	
Valin	+	+	o	o	+	
Serin	+	+	o	o	+	
Cystein	+	+	o	o	+	
Cystin	+	+	o	o	+	
Threonin	+	+	o	o	+	
Glycin	+	+	o	o	+	
Leucin	+	+	o	o	+	
Isoleucin	+	+	o	o	+	
Phenylalanin	+	+	o	o	+	
Asparaginsäure	+	+	o	o	+	
Prolin	+	+	o	o	+	
Lysin	+	+	o	o	+	
Tryptophan	+	+	o	o	+	
Glutaminsäure	+	+	o	o	+	

Abb. Nr. 5

Löslichkeitsverhältnisse der einzelnen Aminosäuren nach Zugabe von Novobiocin und Colistin bei verschiedenen pH-Werten. (Gelöst in Basalmedium n. POLAKIS u. BARTLEY)

+ = Präzipitat

o = gute Löslichkeit

Es war nicht möglich, die Antibiotika Novobiocin und Colistin in synthetischen Nährlösungen zu kombinieren, da sie nur bei einander entgegengesetztem pH-Wert sich mit den einzelnen Aminosäuren vertrugen. Eine Lösung verschiedener Aminosäuren mit den beiden Antibiotika war völlig unmöglich.

Gentamycin hingegen ließ sich in sämtlichen synthetischen Nährmedien verwenden, ohne Ausfällungsreaktionen zu verursachen. Wir konnten außerdem feststellen, daß der antibakterielle Schutz bei Verwendung nur eines Antibiotikums ungenügend war.

Bei der Verwendung in synthetischen Nährlösungen erwies sich eine Kombination von Colistin in einer Konzentration von 60 mcg/ml und Gentamycin in einer Konzentration von 40 mcg/ml als optimal.

5.2. Vorversuche zur Bestimmung der lag-Phase

Da die Testorganismen einen Wachstumsverlauf zeigen sollten, der dem für einzellige Mikroorganismen gültigen Grundsätzen folgen sollte, war es zweckmäßig zunächst einmal den Beginn des Übergangs von der stationären Wachstumsphase in die logarithmische Wachstumsphase zu bestimmen.

Zu diesem Zweck stellten wir aus 0,5 g frisch isolierten Pilzmaterials mit Hilfe des Ultrathuraxgerätes eine Suspension her, brachten diese tropfenweise auf Objektträger und stellten dies zur Auskeimung in eine feuchte Kammer. Alle 4-5 Stunden wurden diese Objektträger mit dem Mikroskop kontrolliert, um den Beginn der Auskeimung zu beobachten. Nach 40 Stunden zeigten die Mikrokonidien die ersten Ansätze zur Auskeimung.

Bei allen Fermentorversuchen wurde die Ausgangssuspension sofort in den Fermentor inkubiert, und nicht erst der Beginn der Wachstumsphase abgewartet, da sich bei einem

Vorversuch gezeigt hatte, daß der Beginn der log-Phase in einer gerührten Kultur wesentlich früher einsetzte, als in einer Standkultur, nämlich in einer Zeit zwischen 18 und 25 Stunden.

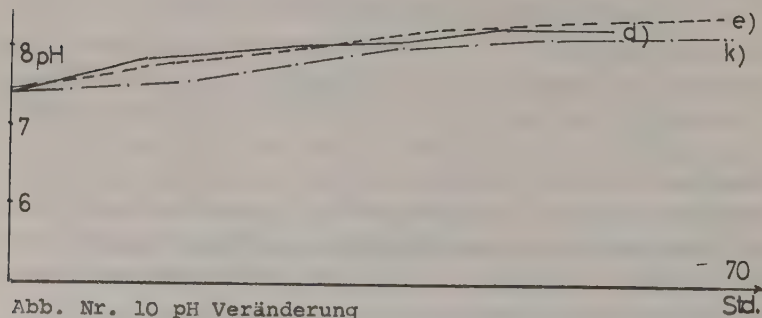
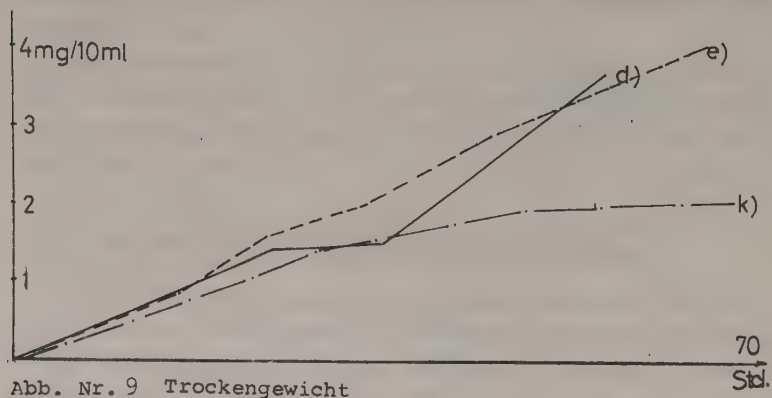
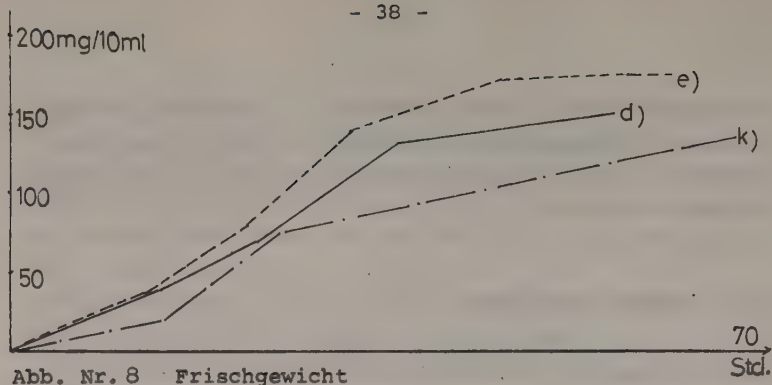
5.3. Fermentorversuche

5.3.1 Versuche mit komplexem Nährmedium (Kimmignähr- lösung)

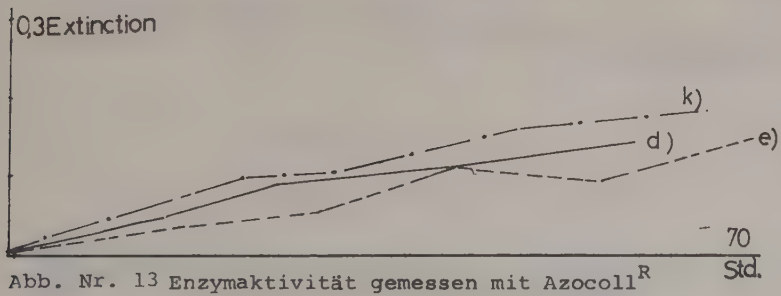
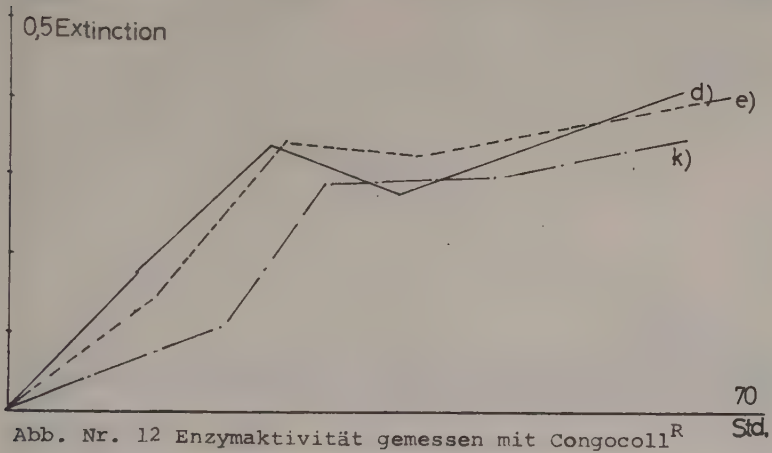
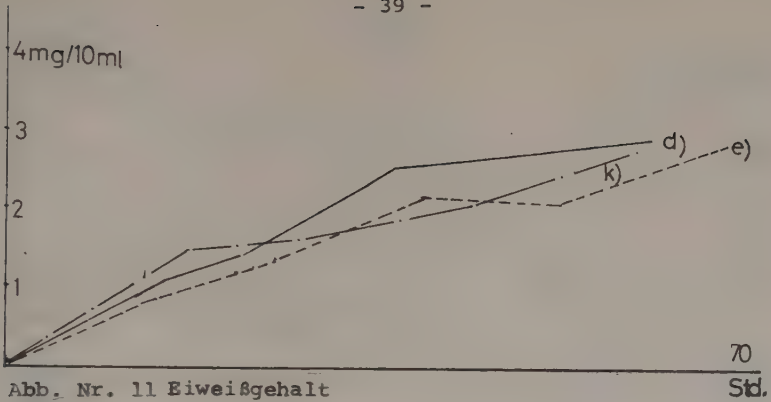
Temp.°C → U/Min ↓	18	20	23	25
100	a)			
200	b)	d)		
300	c)	e), e ₁ , e ₂)	f)	g)
400		k)	h)	
500			i)	

Abb. Nr. 6

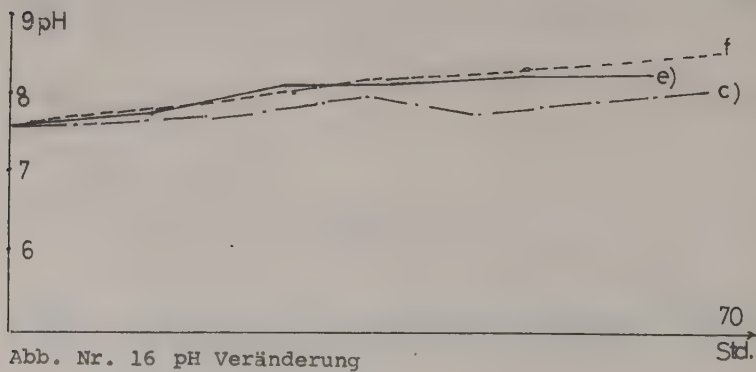
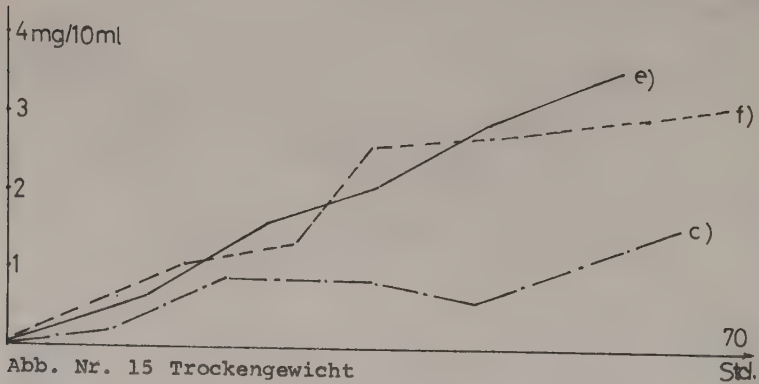
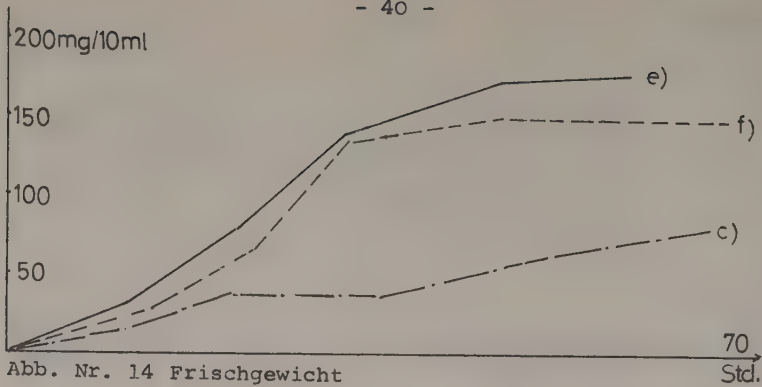
Übersicht der mit Kimmignährmedium durchgeführten Versuche (Buchstabe ohne Fußnote bezeichnet Versuch ohne Zusätze; Fußnote 1: Zusatz von 10^{-6} Mol Giberellinsäure; Fußnote 2: Zusatz von 20 mg Giberellinsäure Die Ergebnisse dieser Versuche sind auf den folgenden Seiten graphisch dargestellt. Die nicht wiedergegebenen Versuche a, b, h und i führten zu ungünstigeren Ergebnissen.



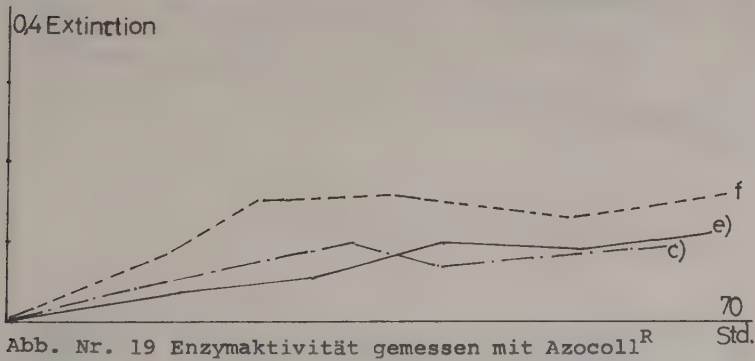
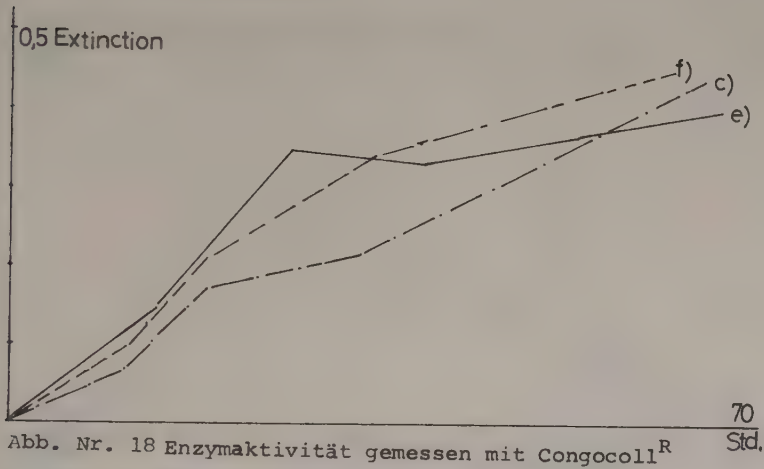
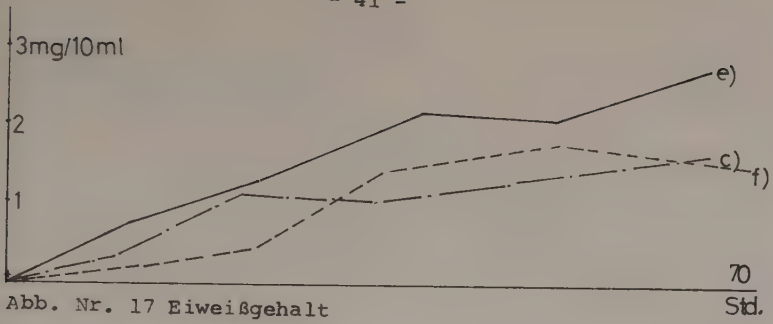
Vergleich der mit *T. mentagrophytes* durchgeführten Versuche bei 20° und verschiedenen U-Zahlen.
 d = 200/min, e = 300/min, k = 400/min.



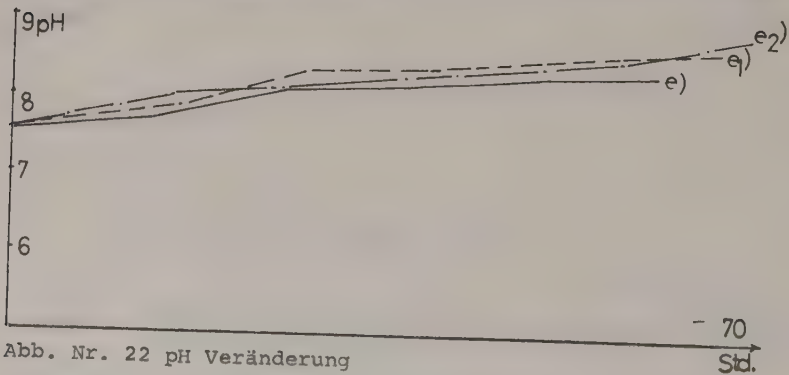
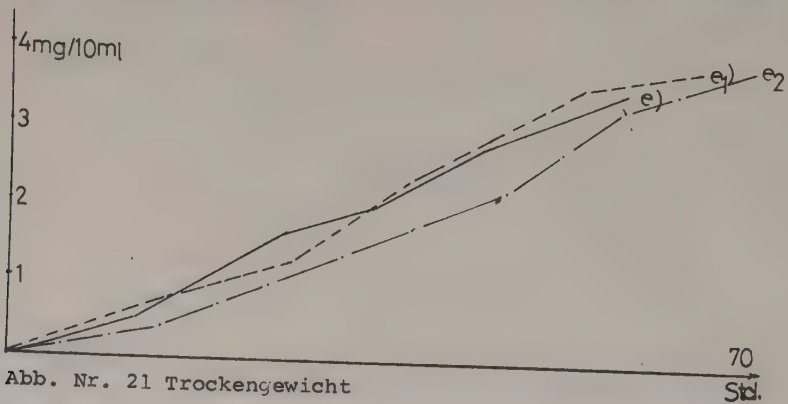
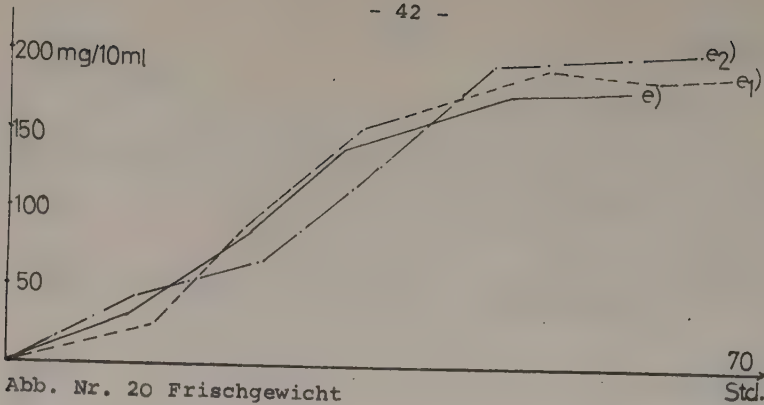
Vergleich der mit *T. mentagrophytes* durchgeführten Versuche bei 20° und verschiedenen U-Zahlen.
d = 200/min, e = 300/min, k = 400/min.



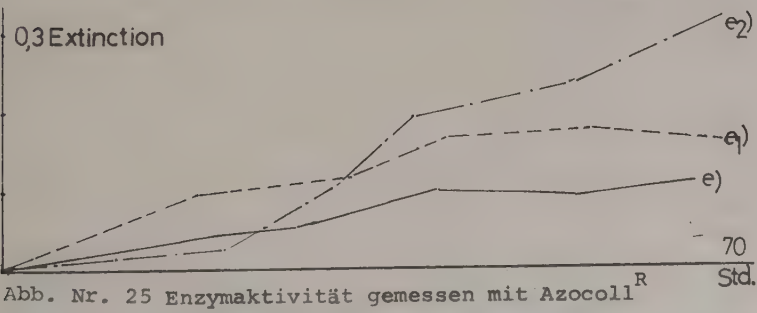
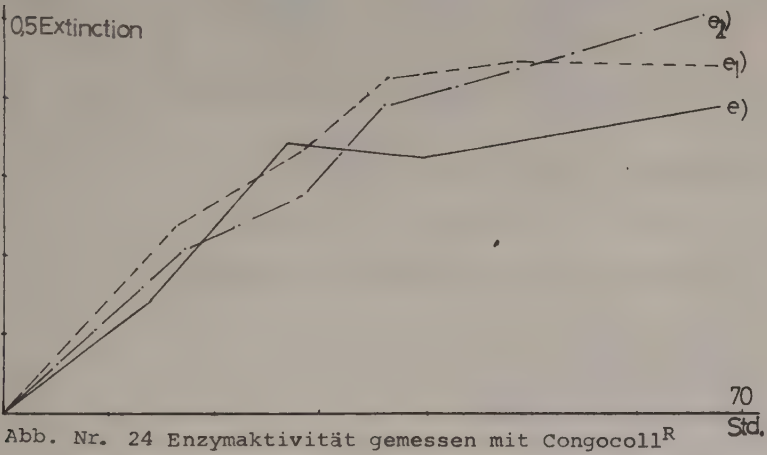
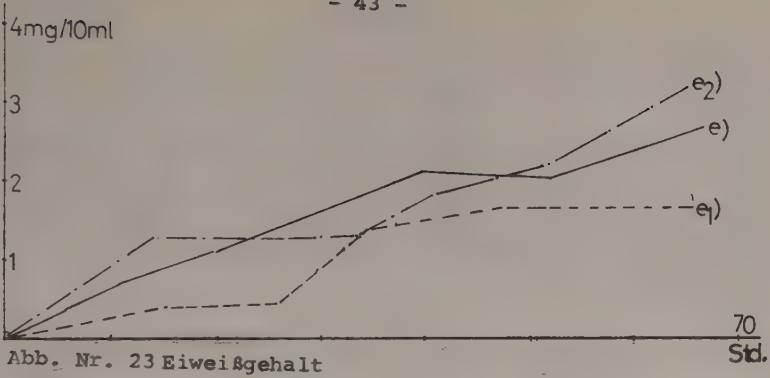
Vergleich d. mit *T. mentagrophytes* durchgeführten Versuche bei 300 U/min. u. verschiedenen Temp. c=18°, e=20°, f=23°



Vergleich d. mit *T. mentagrophytes* durchgeführten Versuche bei 300 U/min. u. verschiedenen Temp. c=18°C, e=20°C, f=23°C



Vergleich d. mit *T. mentagrophvtes* durchgeführten Versuche bei verschiedenen Konzentrationen von Gibberellinsäure
 e = ohne Zusatz, e1 = 10^{-6} Mol Gib.säure, e2 = 20mg Gib.säure



Vergleich d. mit T. mentagrophytes durchgeführten Versuche bei verschiedenen Konzentrationen von Gibberellinsäure
 e = ohne Zusatz, e1 = 10^{-6} Mol Gib.säure, e2 = 20mg Gib.säure

5.3.2. Versuche mit synthetischen Nährlösungen

Da sich bei den Versuchen mit Kimmignährlösung eine Temperatur von 20 Grad C und eine Umdrehungszahl von 300 pro Minute als optimal erwies, wurden nun die folgenden Versuche mit diesen Werten und variierender Nährlösung durchgeführt.

Versuche mit synthetischen Nährmedien
(Temperatur 20 Grad C und 300 U/min.,
von Versuch zu Versuch stufenweiser Aufbau des Nährmediums und Verwendung der Antibiotika Colistin und Gentamycin)

Abkürzungen in nachstehender Tabelle:

G = Glucose, P = KH_2PO_4 , AS = Aminosäure

Durchnummerierung der verwendeten Aminosäuren:

Leucin = AS Nr. 1

Isoleucin = AS Nr. 2

Lysin = AS Nr. 3

Phenylalanin = AS Nr. 4

Glycin = AS Nr. 5

Valin = AS Nr. 6

Histidin = AS Nr. 7

Tyrosin = AS Nr. 8

Tryptophan = AS Nr. 9

Methionin = AS Nr. 10

Asparaginsäure = AS Nr. 11

Glutaminsäure = AS Nr. 12

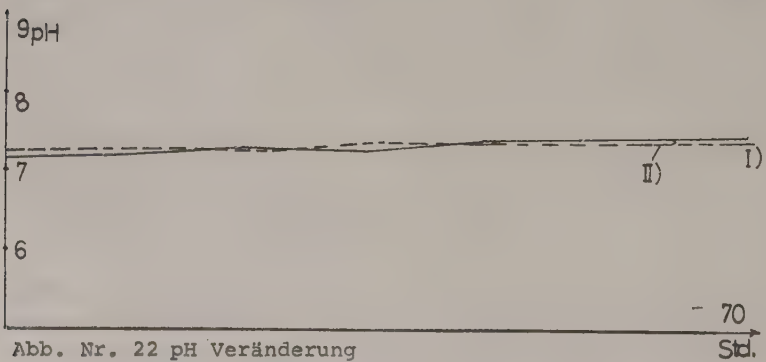
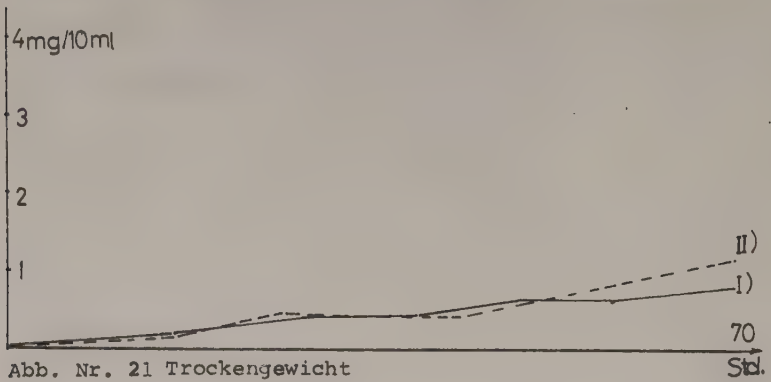
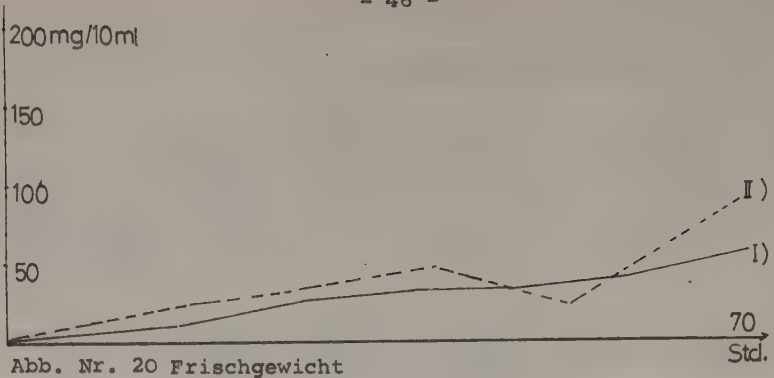
Cystein = AS Nr. 13

Serin = AS Nr. 14

B = Basislösung, Vit. = 0,1 % Vitaminlösung,

Spur = 0,0001 % Spurenstofflösung, Gib. = Giberellinsäure.

Vers. Nr. I	B + 1,5% G + 0,9% P
Nr. II	P + 3,0% G + 1,8% P
Nr. III	B + 3,0% G + 1,8% P + Vit.+ Spur
Nr. IV	B + 3,0% G + 1,8% P + AS Nr.1
Nr. V	B + 3,0% G + 1,8% P + AS Nr.1 + Gib 10^{-2} Mol
Nr. VI	B + 3,0% G + 1,8% P + AS Nr.1 + Gib 20 mg
Nr. VII	B + 3,0% G + 1,8% P + AS Nr.1 + Gib 20 mg + Vit + Spur
Nr. VIII	B + 3,0% G + 1,8% P + AS Nr.1, 4, 11, 12 + Gib 20 mg + Vit + Spur
Nr. IX	B + 3,0% G + 1,8% P + AS Nr. 1 - 14 + Gib 20 mg + Vit + Spur
Nr. X	Versuch wie Nr, IX, nur Temperatur 25 Grad C Umdrehungszahl 500 U/min.



Vergleich d. mit *T. mentagrophytes* durchgeführten Versuche bei verschiedenen Konzentrationen von Glucose u. Phosphat
I = 1,5% Glucose u. 0,9% Phosphat, II = 3% Gluc. u. 1,8% Phos.

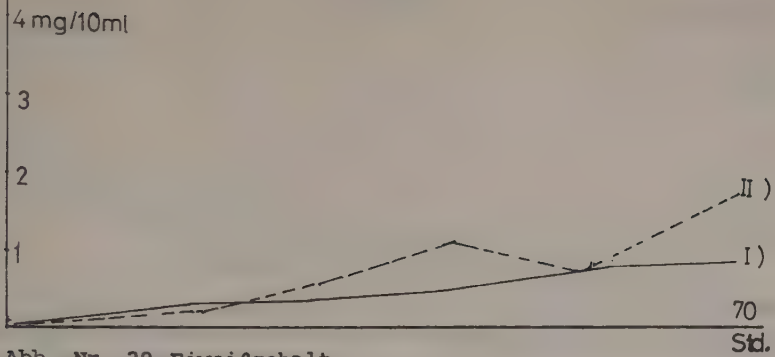


Abb. Nr. 29 Eiweißgehalt

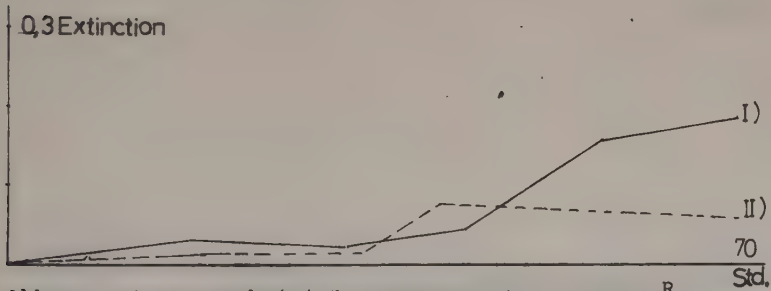


Abb. Nr. 30 Enzymaktivität gemessen mit Congocoll^R

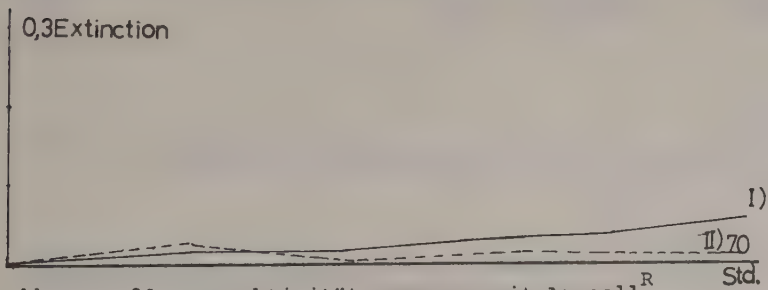


Abb. Nr. 31 Enzymaktivität gemessen mit Azocoll^R

Vergleich d. mit *T. mentagrophytes* durchgeführten Versuche bei verschiedenen Konzentrationen von Glucose u. Phosphat
 I=1,5% Glucose u. 0,9% Phosphat, II=3% Glucose u. 1,8% Phos.

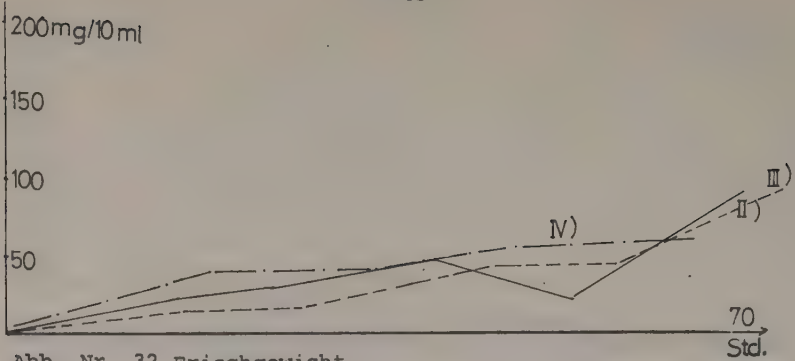


Abb. Nr. 32 Frischgewicht



Abb. Nr. 33 Trockengewicht

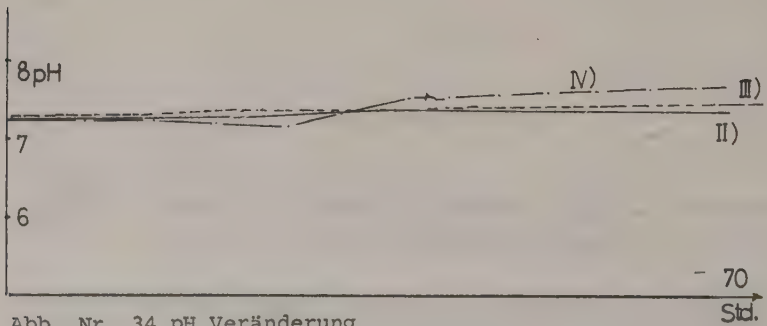
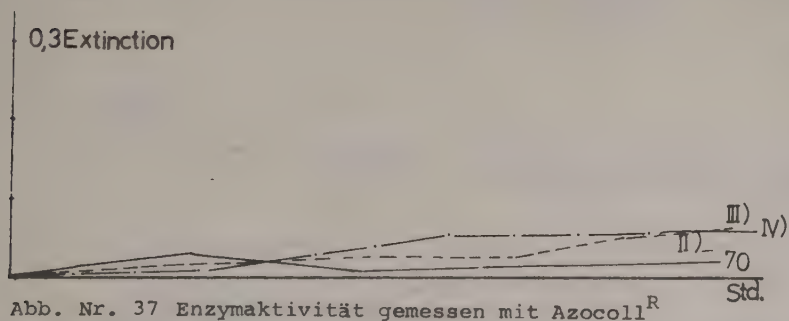
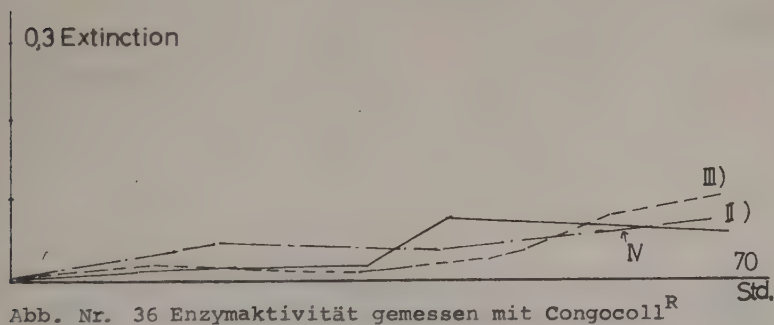
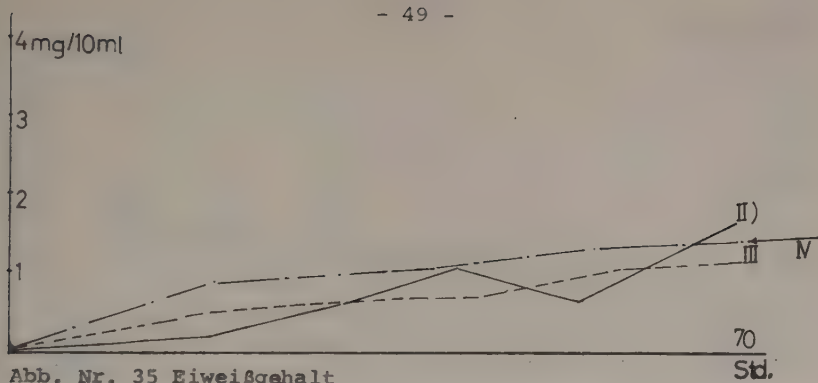
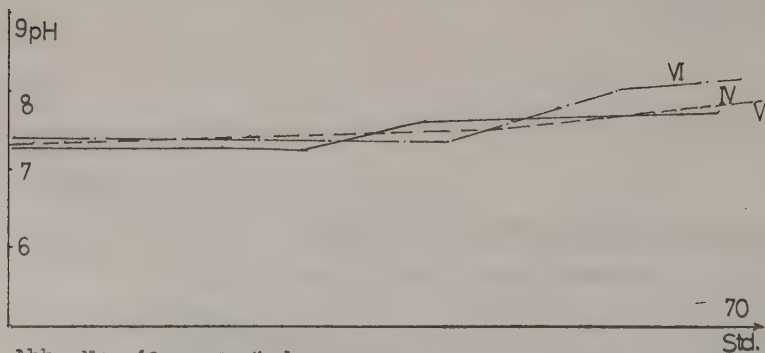
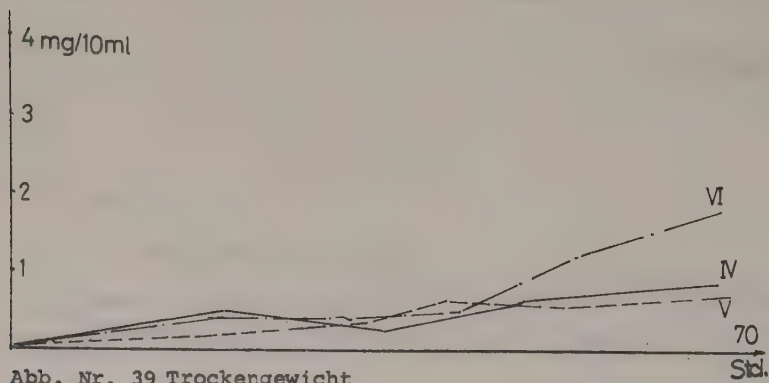
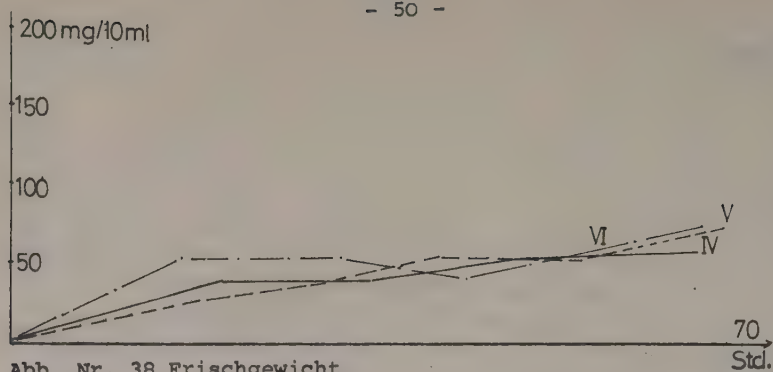


Abb. Nr. 34 pH Veränderung

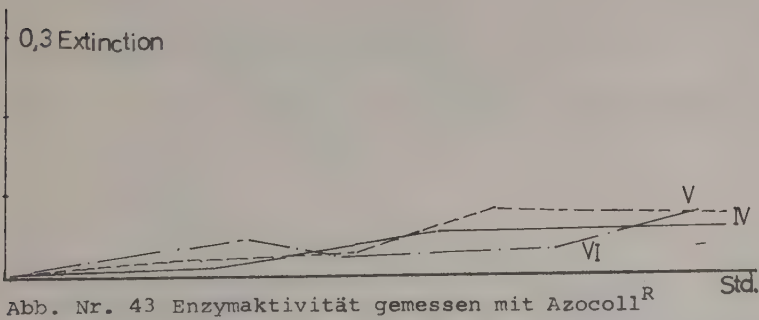
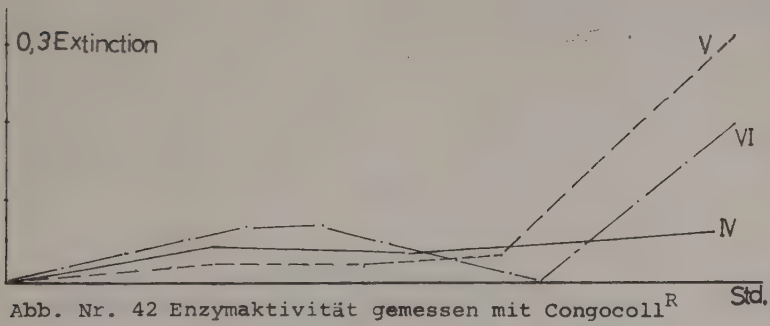
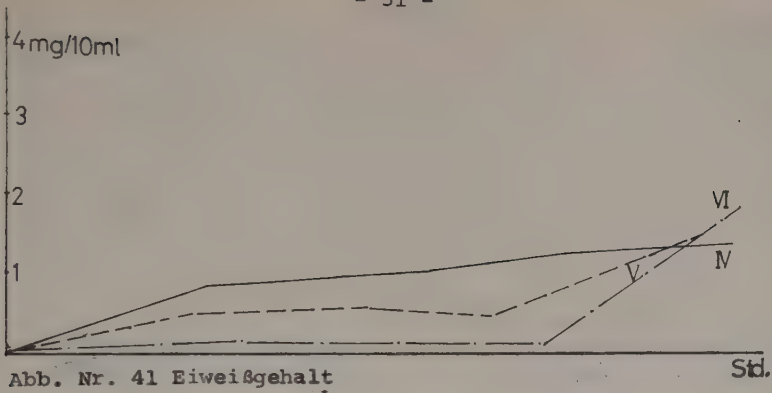
Vergleiche d. mit T. mentagrophytes durchgeführten Versuche
b. verschiedener Zusammensetzung d. Nährmediums. II: B+3,0%
Gluc.+1,8%Phos., III: zusätzlich Vit. u. Spurenst.Lösung
IV: zusätzlich Leucin



Vergleich d. mit *T. mentagrophytes* durchgeführten Versuche
b. versch. Zusammensetzung d. Nährmediums. II: B+3,0% Gluc.+
1,8% Phos., III: zusätzlich Vit. u. Spurenst.Lösg., IV: zusätzlich
Leucin



Vergleich d. mit T.mentagrophytes durchgeführten Versuche mit versch. Nährmedien. IV: B+3,0%Gluc.+1,8%Phos.+As Nr. 1. V: zusätzl. Gib. 10^{-2} Mol. VI: zusätzl. 20mg Gib.



Vergleich d. mit T.mentagrophytes durchgeführten Versuche mit versch. Nährmedien. IV: B+3,0%Gluc.+1,8%Phos.+As Nr.1. V: zusätzl. Gib. 10^{-2} Mol. VI: zusätzl. 20mg Gib.

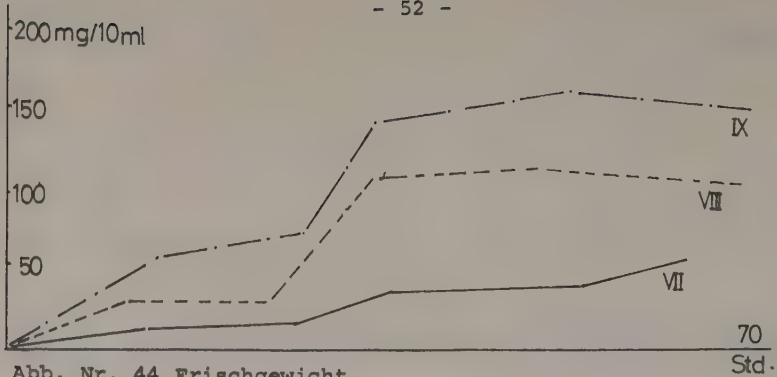


Abb. Nr. 44 Frischgewicht

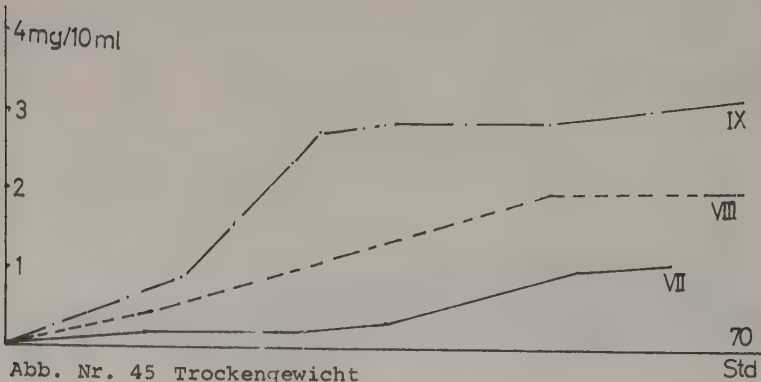


Abb. Nr. 45 Trockengewicht

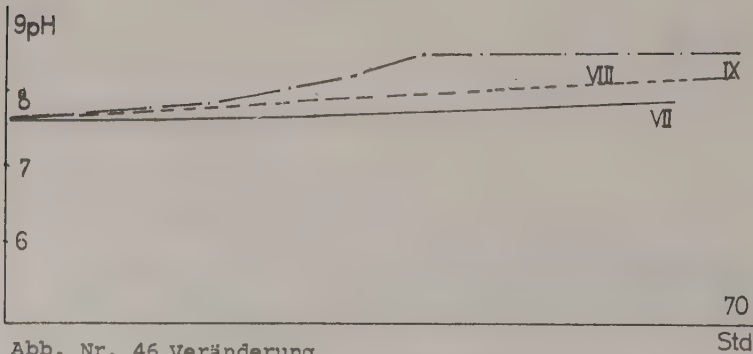
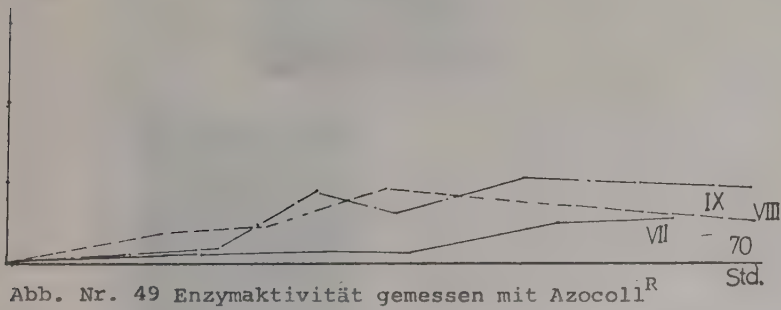
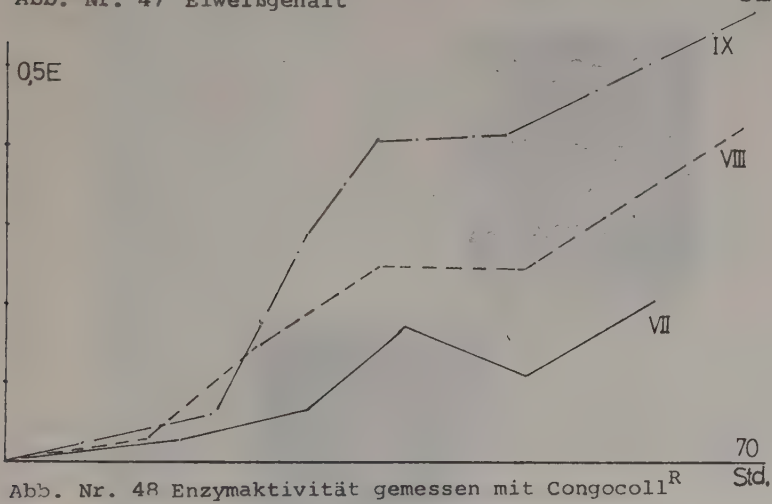
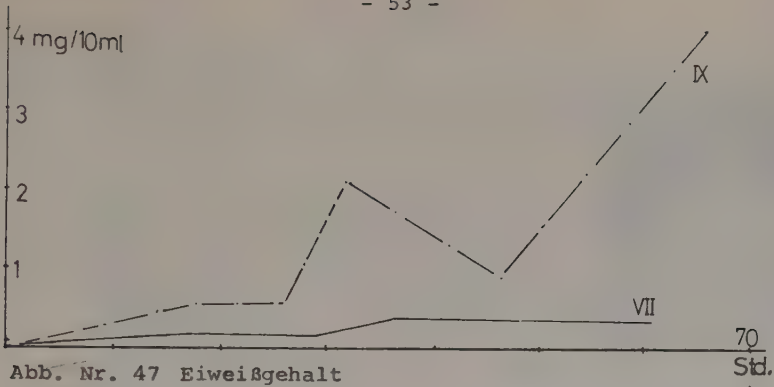


Abb. Nr. 46 Veränderung

Vergleich d. mit T. mentagrophytes durchgeführten Versuche mit versch. Nährmedien. VII: wie Vers. Nr. V+Vit.+Spur. VIII: zusätzl. As Nr. 4, 11, 12. IX: wie Vers. Nr. V+As Nr. 2 - 14.



Vergleich d. mit T. mentagrophytes durchgeführten Versuche mit versch. Nährmedien. VII: wie Vers. Nr.V+Vit.+Spur. VIII: zusätzl. As Nr. 4,11,12. IX: wie Vers. Nr.V+As Nr. 2 - 14.

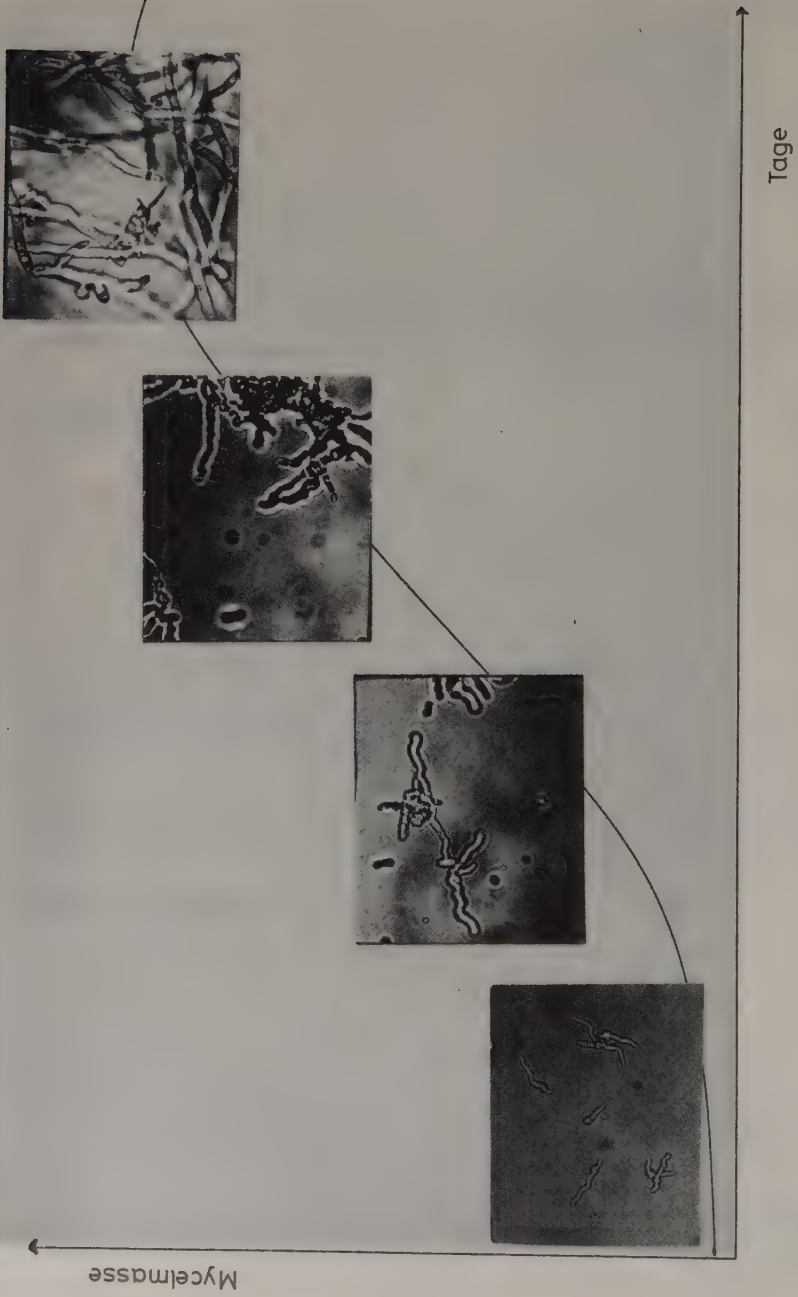


Abb. Nr. 50 Mikroskopische Darstellung der Mycelentwicklung

5.3.3. Versuche mit Candida albicans und Pityrosporum ovale.

Genau wie über Trichophyton mentagrophytes gibt es bis jetzt keine Untersuchungen über die Wachstumskinetik von Candida albicans und Pityrosporum ovale in einem Microferm-Tischfermentor. Diese gehören außerdem in eine völlig andere Kategorie wie Trichophyton mentagrophytes, nämlich zu den Hefepilzen, die im Gegensatz zu den Dermatophyten kein Luftmycel, sondern Sprosszellen bilden. Die Versuchsreihe war hier wesentlich kürzer, um zunächst nur einen Vergleich zu Trichophyton mentagrophytes zu ermöglichen.

Die Hefen wurden über 6 - 10 Tage auf festen Nährböden (Candida albicans auf Kimmig-Agar und Pityrosporum ovale auf Dixon-Agar) angezüchtet und dann in einer Menge von 1,0 g Frischgewicht/1 Nährlösung in den Fermentor inkubiert. (Kimmig-Lösung für Candida albicans, Dixon-Lösung für Pityrosporum ovale).

Die Versuche mit Candida albicans führten wir bei Temperaturen von 20°C, 29°C und 37°C, sowie jeweils mit einer Rührgeschwindigkeit von 200 und 300 Umdrehungen pro Minute durch. Die Versuche mit Pityrosporum ovale führten wir mit den gleichen Rührgeschwindigkeiten und Temperaturen von 34°C und 37°C durch.

Die zu messenden Parameter waren die gleichen, wie bei den vorausgegangenen Versuchen mit Trichophyton mentagrophytes, nämlich Bestimmung des Frischgewichts, des Trockengewichts, des pH-Wertes und der Enzymaktivität. Die angewandte Methodik war ebenfalls die selbe. Auch die Antibiotikakonzentrationen waren die gleichen, wie bei den Versuchen mit Trichophyton mentagrophytes.

5.3.4. Ergebnisse mit Candida albicans.

Die günstigste Wachstumstemperatur für diese Hefe liegt bei 37 Grad C. Zwischen 20 Grad und 30 Grad C konnten wir keinen Unterschied in der Ausbeute an Hefezellen feststellen. Wie bei Trichophyton mentagrophytes war die Umdrehungszahl von 300 U/min am geeignetsten. Der pH-Wert hielt sich in den ersten 4 bis 5 Stunden bei 7,5 und sank dann im Verlauf der nächsten 20 Stunden auf pH 4,5 bis 5,5. Auf dieser Höhe verblieb der pH-Wert während der ganzen restlichen Versuchsdauer bis zu 70 Stunden. Das Frischgewicht nahm in den ersten 50 Stunden zu, danach blieben die Gewichtsbestimmungen bei Werten zwischen 9 und 10 mg/ml. Somit konnte bei Candida albicans mit einem Inoculum von 1 g/l nach 50 Stunden Inkubation eine Ausbeute von 9-10 g/l erreicht werden.

Trockengewichtsbestimmungen und Proteinmessungen mit der Biuret-Methode führten zu sehr ungleichmäßigen, für die Wachstumskontrolle nicht verwertbaren Ergebnissen. Die Versuche, mit Azocoll^R und Congocoll^R als Substrat Proteinase von Candida albicans nachzuweisen, hatten stets ein negatives Ergebnis.

5.3.5. Ergebnisse mit Pityrosporum ovale.

Bei Pityrosporum ovale erwiesen sich alle Verlaufskontrollen als sehr unsicher, da die Hefezellen sehr schnell kleine Klumpen bildeten und sich auch an der Wand des Fermentorgefäßes absetzten. Daher führten wir bei diesem Pilz schließlich nur noch am Schluß der Versuche Trocken- und Frischgewichtsbestimmungen durch.

Die Ausbeute an Hefezellen war unabhängig von der verwendeten Temperatur (34 Grad und 37 Grad C) und der Rührgeschwindigkeit in den einzelnen Versuchen ohne erkennbare Ursache recht unterschiedlich: Nach 7 bis 10 Tagen erhielten wir zwischen 7,1 und 9,4 g Hefezellen (frisch) pro l, in einem Versuch sogar 15,6 g/l. Nach 10 bis 12 Tagen fanden wir 11,0 bis 20,0 g/l. Ein über 25 Tage fortgeführter Versuch erbrachte 17,3 g/l. Dabei ist bemerkenswert, daß auch ohne Benutzung des Rührwerkes Hefezellen in gleicher Menge gewonnen werden konnten. Die Trockengewichtsbestimmungen bei diesen Untersuchungen ergaben mit größeren Hefezellmengen konstantere Werte, die sich zum Frischgewicht durchschnittlich wie 1 : 6,6 (5,8 - 7,3) verhielten. Der pH-Wert der Dixon-Lösung (Ausgangswert pH 6,0) veränderte sich während der Versuche nur wenig auf pH 5,8 bis 5,6. Auch bei *Pityrosporum ovale* ließen sich keine proteolytischen Aktivitäten mit Azocoll^R oder Congocoll^R als Substrat nachweisen.

6. Diskussion der Versuchsergebnisse

6.1. Einfluß von Temperatur und Umdrehungszahlen

Über einen Temperaturbereich von 18 bis 23 Grad Celsius und einen Umdrehungszahlenbereich von 200 bis 400 zeigte *Trichophyton mentagrophytes* weitgehend gleichartiges Verhalten. Frischgewicht, Trockengewicht, Eiweißgehalt und Enzymaktivität wichen nur in geringfügigem Ausmaß von einander ab. Das Frischgewicht zeigte einen deutlich exponentiellen Wachstumsverlauf, und auch die Steigung der Enzymaktivität erwies sich als exponentiell. Das Maximum der Gewichtszunahme, der Enzymaktivität und der Zunahme des Eiweißgehaltes war nach 60 - 70 Stunden erreicht. Als optimal erwies sich eine Kombination von 20 Grad Celsius und 300 U/min.

(Versuch e)

In einer Versuchsreihe hielten wir die Rührgeschwindigkeit konstant bei 300 U/min und veränderten die Temperatur von 18 Grad C (Versuch c) auf 20 Grad C (Versuch e), dann auf 23 Grad C (Versuch f) und schließlich auf 25 Grad Celsius (Versuch g). Versuch e hatte die beste Veränderung aller Parameter ergeben. Bei konstanter Temperatur von 20 Grad C unternahmen wir die Versuche d, e, k, um den Einfluß der Rührgeschwindigkeit auf die Veränderung der zu messenden Parameter zu überprüfen. Auch hier erbrachte e) die besten Ergebnisse. Die Umdrehungszahl und Temperatur von e) machten wir zu Ausgangswerten für die Versuche mit synthetischen Nährlösungen. Bei diesen Versuchen hatte der Versuch IX die besten Ergebnisse. Temperaturen von 18 oder 25 Grad C bei den Versuchen a - c und f - g brachten deutlich geringere Gewichtsanteile.

Großen Einfluß hatte die Umdrehungszahl des Rührwerks auf die Homogenität der Kultur. Bei geringen Umdrehungszahlen bildeten sich nach 10 - 15 Stunden Mycelklümpchen aus, die sich vor allem am Rührwerk und am Boden des Glasbehälters ablagerten. BURKHOLDER und SINNOT (6) beschrieben bereits diese charakteristischen Mycelklümpchen in geschüttelten Flüssigkulturen.

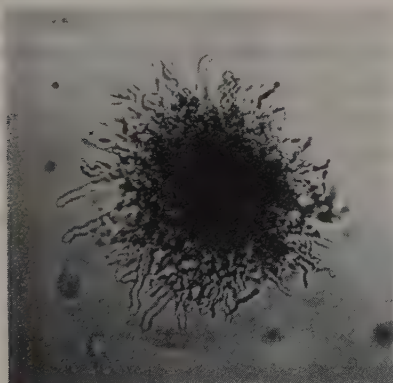


Abb.Nr. 51 Mycelklümpchen

Die homogensten Kulturen erhielten wir mit Umdrehungszahlen von 400 und 500. (Versuch g) Diese Kulturen blieben auch über einen Zeitraum von 80 Stunden in ihrem homogenen Zustand. Was mit diesen Umdrehungszahlen nicht erreicht werden konnte, das waren hohe Gewichtsausbeuten.

Schaumbildung in Kulturlösungen trat nie auf. Ein anfängliches leichtes Aufschäumen der Kulturen bei höheren Umdrehungszahlen des Rührwerkes beeinträchtigte das Mycelwachstum in keiner Weise. Auf die von ZYLAY (80) et al.

beschriebene Anwendung von Siliconen in der mykologischen Kulturtechnik konnten wir verzichten, ebenso wie auf ein elektronisch gesteuertes Antifoamgerät der Fa. New Brunswick Sci. C.

6.2. Zur Morphologie der Kulturen

Was die Mycelmorphie betrifft, so konnten die von RAUBITSCHKE (50) und KLEIN (32) gefundenen Ergebnisse bestätigt werden. Es waren kaum Fruchtformen in den Kulturen zu finden, vor allem fanden wir nie Makrokonidien. Auch eine Pigmentierung des Mycels trat nicht auf. Bei den bereits angegebenen optimalen physikalischen Parametern wuchs im Verlauf von ca. 70 Stunden sehr dichtes, homogenes Mycel.(Abb. Nr. 50 und 52)

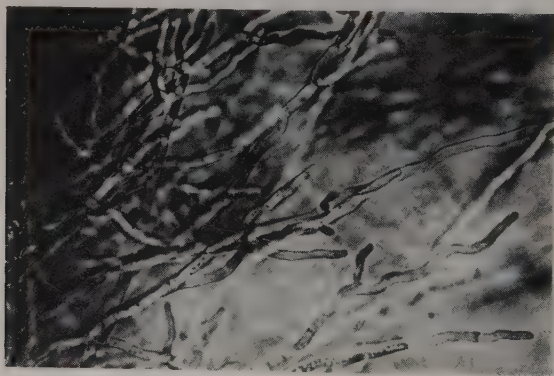


Abb. Nr. 52

In sämtlichen Versuchen neigte *Trichophyton mentagrophytes* zu sehr pleomorphem Wachstum.

6.3. Veränderung des pH-Wertes

Die Veränderung des pH-Wertes war bei allen Versuchen signifikant. In Kimmignährlösung stieg der pH-Wert von einem Ausgangswert von 6 - 6,5 auf einen Endwert von 7,5 - 8,0. (Versuche a - i) Bei den Versuchen I - X mit synthetischen Nährmedien stieg der pH-Wert in einem Bereich von 7,5 bis 8,0. Bei Befall mit Bakterien dagegen fiel der pH-Wert bis auf 4,5. Selbst ohne mikroskopische Kontrolle des Wachstumsverlauf war dies der sicherste Indikator für das einwandfreie Wachsen einer Kultur. Schon RIETH, REFAI (54) und HANTSCHKE (24) beschrieben diese pH-Veränderungen bei Standkulturen.

6.4. Veränderung des Trocken- und Frischgewichts

Die Kurven der Trocken- und Frischgewichtswerte zeigten bei allen Versuchen einen ansteigenden Verlauf, zum Teil linear ansteigend, zum Teil exponentiell zunehmend. Am deutlichsten war dies bei den Versuchen Nr. e)₁, e)₂ und Nr. VIII und Nr. IX zu sehen. Die Versuche I-VI ergaben kaum eine nennenswerte Gewichtsausbeute.

6.5. Veränderung des Eiweißgehalts

Der Anstieg des Eiweißgehaltes verhielt sich entsprechend der Gewichtszunahme. Die Versuche mit den höchsten Gewichtsmengen ergaben auch die meiste Zunahme an Eiweißgehalt. Für eine exakte Bestimmung derart kleiner Gewichtsportionen war die Methode relativ ungenau, sie sollte jedoch in erster Linie dazu dienen, eine vergleichende Aussage zu ermöglichen. Es sollte mit diesen Versuchen nur durch Vergleich der verschiedenen zu messenden Parameter eine Aussage über die optimalen physikalischen Bedingungen bei Kimmignährlösung gemacht werden.

6.6. Enzymaktivitäten

Der Anstieg der Enzymaktivität zeigte bei einigen Versuchen ebenfalls einen deutlichen exponentiellen Verlauf. Die von DORN und RIVERA (12) bei *Aspergillus nidulans* gefundene logarithmisch verlaufende Enzymaktivität zeigte sich auch bei *Trichophyton mentagrophytes*. In Kimmig-nährlösung war die Höhe der Enzymaktivität bzw. das Ansteigen derselben während des Wachstums im Fermentor von optimalen physikalischen Parametern abhängig. Auch hier waren die Versuche e₁, e₂ und IX optimal.

6.7. Einfluß der Giberellinsäure

Die Verwendung der Giberellinsäure als wachstumsstimulierendes Phytohormon in den von ESTEL (15) angegebenen Konzentrationen erwies sich als wirkungslos. Bei einer Konzentration von 0,01 % war allerdings eine wachstumsfördernde Wirkung um ca. 15 % zu sehen (Versuche e₂). Mit dem Hormoncharakter der Substanz läßt sich dies allerdings nicht mehr vereinbaren.

6.8. Wirkung der synthetischen Nährmedien

Der Versuch, *Trichophyton mentagrophytes* nur mit der Basislösung nach POLAKIS und BARTLEY (50) und einem 1,5 %igen Zusatz von Glucose zu züchten, mißlang. Das Mycel verblieb in einer stationären Wachstumsphase. (Versuche I - V)

Erst die Zugabe von Phosphat, Glucose und Leucin ergab eine signifikante Wachstumssteigerung. Gewicht, Eiweißgehalt und Enzymaktivität erhöhten sich allmählich bei Zugabe der verschiedenen Aminosäuren und der Vitaminlösung und der Spurenelemente.

Einen deutlich messbaren Effekt auf das Wachstum hatten Vitaminzugaben und Spurenelemente nicht.

Je mehr Aminosäuren zugegen wurden, umso eher verlor die Mycelkultur an Homogenität. Bei Rührgeschwindigkeiten von 200 bis 300 U/Minute bildeten sich in den synthetischen Nährmedien kleine Klümpchen von Mycel. Es begannen Aminosäuren in kleinen Kristallen auszufallen, um die sich nach spätestens 20-stündiger Versuchsdauer Mycelbruchstücke sammelten. Der Versuch X ergab bei 500 U/min wieder eine größere Homogenität des Mycels.

Wenn man Kimmignährlösung mit der optimalsten Aminosäurenlösung vergleicht, so kommt man zu dem Ergebnis, daß der Kimmignährlösung der Vorzug zu geben ist. Hier bilden sich stets homogenere Kulturen. Die Gewichtsausbeute ist zwar kaum unterschiedlich, jedoch treten in Kimmignährlösung kaum Fällungsreaktionen auf.

Bei allen Versuchen beobachteten wir folgendes: Obwohl in der Ausgangssuspension sämtliche Mikrokonidien im gleichen Wachstumsstadium waren, so fanden sich doch nach einer Wachstumszeit im Fermentor von 70 Stunden noch viele unterschiedliche Wachstumsstufen, d.h. es waren noch viele ungekeimte Konidien zu finden.

6.9. Kurzer Vergleich der Untersuchungsergebnisse bei *Trichophyton mentagrophytes* mit den Ergebnissen bei *Candida albicans* und *Pityrosporum ovale*.

Gegenüber den beiden Hefepilzen zeigte sich, daß nur bei *Trichophyton mentagrophytes* eine genaue Verlaufskontrolle der Wachstumskinetik mit den von uns gemessenen Parametern möglich war. Die Bestimmung der Proteasenaktivität versagte bei diesen völlig und die Bestimmung des Frisch- und Trockengewichts war zu ungenau. Lediglich bei *Candida albicans* konnte man ein annähernd lineares Wachstumsverhalten erkennen.

7. Anhang

Untersuchungen zum Nachweis von Proteinasen bei Trichophyton mentagrophytes mit den Substraten Azocoll^R und Congocoll^R

Azocoll^R (Calbiochem Cat. N. 19 493) und Congocoll^R (Calbiochem Cat. No. 2348) sind Proteine, die einen komplex gebundenen Farbstoff enthalten, der durch Proteinasen bei der enzymatischen Hydrolyse des Proteins zu einem proportionalen Anteil freigesetzt wird. Der Farbstoff kann photometrisch gemessen werden (Azocoll bei 520 nm, Congocoll bei 496 nm). Für Trypsin (Calbiochem Cat. No. 6502) werden nach Angaben der Hersteller konstante Werte zwischen $E = 0,12$ bis $0,7$ entsprechend einer Enzymmenge von 2 bis 8 μg erhalten.

In unseren Versuchen verwendeten wir zunächst sechs verschiedene Trichophyton mentagrophytes Stämme, die im Microferm-Fermentor unter konstanten Bedingungen (20°C, 300 U/min) über 72 Stunden angezüchtet wurden. Von dem Überstand der Nährlösung wurden je 3 ml entnommen und mit 2 ml Phosphatpuffer pH 7,5 (nach Sörensen) versetzt. Der Phosphatpuffer enthielt eine Substratsuspension, die auf 2 mg Substrat pro ml Endkonzentration berechnet war. Nach Inkubation auf einem Magnetrührer über 15, 30 und 60 min. wurde die Extinktion gegen einen Leerwert (Substratsuspension ohne Nährlösung) gemessen.

Mit Azocoll^R als Substrat erhielten wir nach 15 min. Extinktionen um 0,02, nach 30 min. Werte zwischen 0,03 und 0,05; nach 60 min. lagen die Extinktionen zwischen 0,06 und 0,08. Mit Congocoll^R ließen sich höhere Extinktionswerte erreichen. Im einzelnen lagen hier die Extinktionen: nach 15 min. zwischen 0,05 und 0,2; nach 30 min. zwischen 0,2 und 0,8; nach 60 min. zeigte sich hier teilweise ein Absinken der Extinktionswerte, zum Teil ein An-

stieg bis 1,7. Am besten waren die nach 30 min. gewonnenen Werte zu verwenden, da nach 60 min. Inkubationszeit bereits sehr starke Abweichungen auftraten, während nach 15 min. die gemessenen Extinktionen noch zu niedrig lagen.

Mit zwei Trichophyton mentagrophytes-Stämmen führten wir Enzym-Hemmversuche aus. Dabei verwendeten wir entsprechend den Untersuchungen von ZIEGLER (80) die folgenden Substanzen in einer Konzentration von $10^{-2}M$: Natriumfluorid, $ZnSO_4$, $HgCl_2$, $CuSO_4$, 8-Oxychinolin, Natrium, Diäthylthiocarbamat, Natrium-Pentachlorphenol und p-Mercuribenzoat. Eine eindeutige Enzymhemmung wurde nur unter der Einwirkung von $ZnSO_4$, $HgCl_2$ und $CuSO_4$ beobachtet. NaF blieb ohne Einfluß auf die Freisetzung der Farbstoffe, während durch 8-Oxychinolin, Natrium-Pentachlorphenol und p-Mercuribenzoat sogar höhere Extinktionswerte hervorgerufen wurden. Hierbei blieb ungeklärt, ob dieser Effekt auf eine chemische Beeinflussung des Farbstoffes oder des Substrates zurückzuführen ist.

Die mit Azocoll^R und Congocoll^R durchgeführten Vorversuche zeigen, daß es mit diesen Substraten möglich ist, Proteinasen des Dermatophyten Trichophyton mentagrophytes nachzuweisen. Wir verwendeten daher diese Nachweismethode bei unseren weiteren Versuchen zur Feststellung der proteolytischen Aktivitäten im Nährmedium nach Inkubation der Pilze unter verschiedenen Bedingungen im Microfermentor.

8. Zusammenfassung

Der Hauptzweck der vorliegenden Arbeit war das Studium der Wachstumskinetik von *Trichophyton mentagrophytes* in einem Microferm-Tischfermentor zur Ermittlung der optimalen Wachstumsbedingungen.

Ausschließlich zu Vergleichszwecken wurden einige wenige Versuche mit *Candida albicans* und *Pityrosporum ovale* durchgeführt. Das Endziel war, in möglichst kurzer Zeit möglichst große Mengen von Mycel herzustellen. Die Menge des gewonnenen Mycels wurde durch die Messung folgender Parameter objektiviert:

1. Bestimmung des Frischgewichts
2. des Trockengewichts
3. des Eiweißgehalts
4. der Proteasenaktivität

Die Versuche wurden erstens mit Kimmignährlösung und zweitens mit synthetischen Nährlösungen durchgeführt, wobei die Letzteren von einer Basislösung nach POLAKIS ausgehend systematisch mit den Aminosäuren Methionin, Histidin, Valin, Serin, Threonin, Cystein, Lysin, Leucin, Isoleucin, Tryptophan, Glutaminsäure, Asparaginsäure und Phenylalanin aufgebaut wurden.

Durch die Anwendung dieser vier Meßmethoden gelang es relativ exakt, den Wachstumsverlauf der Pilze in dem Microferm-Tischfermentor zu bestimmen.

Die Versuche führten wir mit folgenden physikalischen Parametern durch: Rührgeschwindigkeiten von 100 - 500 Umdrehungen pro Minute und Temperaturen von 18 - 25 °C, wechselnd kombiniert mit den verschiedenen Nährlösungen. Weiterhin untersuchten wir die Beeinflussungsmöglichkeit des Wachstums im Fermentor durch Gibberellinsäure in Konzentrationen von 10^{-6} Mol bis 20 mg/l.

Eine optimale Gewichtsausbeute und höchste Enzymaktivitäten konnten mit Kimmignährlösung bei 20 °C, 300 U/min und 20 mg Giberellinsäure, sowie außerdem unter den gleichen Bedingungen mit einer synthetischen Nährlösung, die die volle Basislösung mit Vitaminen und Spurenelementen und sämtliche angegebenen Aminosäuren plus der gleichen Menge Giberellinsäure wie oben beinhaltete erreicht werden.

Unter derartigen Versuchsbedingungen erwies sich der Wachstumsverlauf der Dermatophyten gemessen sowohl am Frischgewicht, Trockengewicht als auch am synthetisiertem Eiweiß und Proteinasengehalt als deutlich exponentiell. Das heißt, daß diese vier Parameter durchaus dazu geeignet sind, die Wachstumskinetik von Dermatophyten in einem Microferm-Tischfermentor zu objektivieren.

Sämtliche Versuche entstanden unter Antibiotikaschutz. Da die verwendeten Antibiotika Colistin, Novobiocin und Gentamycin in synthetischen Nährlösungen Fällungsreaktionen zeigten, erwies sich Kimmignährlösung als deutlich überlegen.

Es konnte bei allen Versuchen im Fermentor eine starke Neigung zu pleomorphem Wachstum festgestellt werden. Makrokonidien waren in keinem Fall feststellbar. Die Bildung von Mikrokonidien war ebenfalls sehr gering. Bei den Versuchen mit *Candida albicans* und *Pityrosporum ovale* war lediglich die Bestimmung des Frisch- und Trockengewichts exakt. In einem Abschnitt der Arbeit wurde versucht, die Pilz-Proteasen durch Anwendung von Enzym-Inhibitoren näher zu charakterisieren.

9. Literaturverzeichnis

1. Ahearn, D.G.
Meyers S.P. and
Nichols R.A. Extracellular Proteinases of yeasts
and yeastlike fungi.
Appl.Microbiol. 16, 1370-1375 (1968)
2. Archibald, R.M. and
Reiss F. Some biochemical implications from
a study of growth of pathogenic
fungi on media containing single
aminoacids.
Ann.N.Y.Sci.Acad. 50, 1388-1404
(1950)
3. Bentley, L. Enzymes of pathogenic fungi.
J.gen.Microbiol. 8, 365-381 (1953)
4. Böhme, H. Pleomorphism of dermatophytes.
Przegl.Derm. 53, 715-719 (1966)
5. Bonar, L. and
Dreyer A.D. Studies on ring worm funguses with
reference to public health problems.
Am.J.Pub.Health 22, 909-926 (1932)
6. Burkholder, P.R.
and Sinnot E.W. Morphogenesis of fungus colonies
in submerged shaken cultures.
J.gen.Microbiol. 9, 419-425 (1969)
7. Bouillene, R. et
Bouillene-Walrand,M. Influence du pH sur l'actioninhibitrice
des hormones vegetales de synthese
dans la croissance de Trichophyton
(div. spec.).
Bull.acadroy.sci. Liege, 20, 617-633
(1951)
8. Chattaway, Ellis,
Barlow Peptidases of dermatophytes
J.invest.Derm. 41, 21-73 (1963)
9. Chattaway, Thompson
Barlow Enzymes of Microsporum canis.
Biochem. Biophy. Acta N.Y. 14,
583-592 (1954)

10. Dawson, P.S. Continuous phased growth with a modified chemostat.
Canad.J.Microbiol. 2, 893-903 (1965)

11. Dawson, P.S. The intracellular aminoacid pool of *Candida utilis* during growth in batch and continuous flow cultures.
Biochem.Biophys.Acta 3, 53-66 (1965)

12. Dorn, G. and Rivera W. Kinetics of fungal growth and phosphatase-formation in *Aspergillus nidulans*.
J.of Bacteriology 92, No. 6 (1966)

13. Drouhet, E. Recherches sur la nutrition des dermatophytes des acides amines sur la croissance et la morphogenese
Ann.Inst.Pasteur 82, 348-355 (1952)

14. English, M.P. and Barnhard N.H. The effect of trace metal deficiency on some trichophyton strains.
Trans.Brit.mycol.Soc. 38, 78-82 (1955)

15. Estel, U. Der Einfluß von Auxinen, Herbiziden und Antiauxinen auf menschenpathogene Pilze.
Dissertation Hamburg (1966)

16. Fegeler, T. Untersuchungen zu aktuellen Fragen der medizinischen Mykologie.
Mykosen 1, 19-25 (1958)

17. Fujii, T. Biochemical studies on pathogenic fungi. Nutritional studies on *Trichophyton gypseum* with special reference to its pleomorphism.
Pharm.Bull.Tokyo 5, 503-508 (1957)

18. Georg, L.K. Influence of nutrition on growth and morphology of dermatophytes. Tr.New York Acad.Sci. 2, 281-286 (1949)

19. Georg, L.K. The nutrient requirements of the faviform trichophytons. Ann.N.Y.Acad.Sci. 50, 1315-1347 (1950)

20. Georg, L.K. The relation of nutrition to the growth and morphology of Trichophyton violaceum. The vitamin and aminoacid requirements of T. violaceum. Mycologia 43, 297-309 (1951)

21. Goddard, D.R. Phases of the metabolism of Trichophyton interdigitale. J.Infect.Dis. 54, 149-153 (1934)

22. Götz, H. Der Einfluß des Pilzwachstums auf die Wasserstoffionenkonzentration des Nährbodens. Arch.klin.Exp.Derm. 211, 328-335 (1960)

23. Götz, H. und Der Einfluß von Spurenelementen auf das Wachstum des Microsporon gypseum und Trichophyton mentagrophytes. var.gran. Der Hautarzt 13, 104-108 (1962)

24. Hantschke, D. Der Einfluß von Bakterien auf das Dermatophytenwachstum in vitro. Arch.klin.exp.Derm. 227, 603-606 (1965)

25. Hopkins, J.G. and Fermentation reactions of the ring-wurm fungi I. Differentiation of the Trichophyton and allied genera from other fungi. Arch.Derm.Syph. 8, 619-624 (1923)

26. Hopkins, J.G. and Iwamoto Fermentation reactions of the ring-wurm fungi II. Characteristics of three divisions of the Trichophyton group.
Arch.Derm.Syph.(Chic.) 8, 838-843 (1923)

27. Jahnke, G. Experimentelle Studien über den Einfluß von Hormonen auf das Wachstum pathogener Pilze.
Mykosen 2, 7-26 (1959)

28. Johnson, M.J. Aerobic microbial growth at low oxygene concentrations.
J.Bact. 94, 101-108 (1967)

29. Kaden, R. Vitamine und Pilzwachstum
Arch.Derm.Syph. 200, 336-360 (1955)

30. Kaden, R. Der Einfluß von B-Vitaminen und Organextrakten auf Trichophyton interdigitale und Candida albicans.
Arch.Derm.Syph. 197, 528-541 (1954)

31. Klein, D.T. Interrelation of pH, temperature and growth in the induction of pleomorphism in Trichophyton mentagrophytes.
Mycologia 56, 656-661 (1964)

32. Klein, D.T. Effect of carbon and nitrogen nutrition on the pleomorphism in Trichophyton mentagrophytes.
Amer.J.Bot. 52, 979-983 (1965)

33. Koch, H.A. und Koch Y. Enzymchemische Untersuchungen an Sprosspilzen.
6. Tagg.d.Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft Wien (1966)

34. Lassig, G. Literaturübersicht der human- und veterinärmedizinischen Mykologie und Antimykotikaforschung.
Dissertation Leipzig (1968)

35. Leise, M.J. and James L.H. An alkaline medium and procedure for the selection of dermatophytes in the presence of saprophytic fungi. J.Lab.Clin.Med. 30, 119-131 (1945)

36. Lewis, G.M. and Hopper M.E. An introduction to medical mycology. 3rd Ed. Year Book Publishers Chicago (1948)

37. Machlis, I. Factors affecting the lagphase of the growth of the filamentous fungal *Allomyces macrogyn*. Amer.J.Bot. 44, 113-119 (1965)

38. Mandels, G.R. Kinetics of fungal growth. In Ainsworth G.C. and Susmann "The Fungi". (1965)

39. McVeigh, J. and Campbell F. The growth of trichophyton mentagrophytes and five of its variants as affected by several nitrogen sources. Mycologia 42, 451-469 (1950)

40. Meinhof, W. Untersuchungen zur Struktur und Funktion hautpathogener Pilze unter besonderer Berücksichtigung histochemischer Befunde. Habil.-Schrift Marburg (1967)

41. Meinhof, W. Über den Einfluß des Phosphat- und Stickstoffangebotes auf das histochemische Verhalten hydrolytischer Enzyme in Dermatophyten. Arch.klin.exp.Derm. 230, 209-222 (1967)

42. Meinhof, W. On the functional organisation of the dermatophytes. Mykosen 10, 355-366 (1967)

43. Meinhof, W. Zum histochemischen Nachweis von Enzymen in hautpathogenen Pilzen. II. Mitteilung. Dermatophyten. Arch.klin.exp.Derm. 226, 48-63 (1966)

44. Mosher, W.A.
Saunders D.H.
Kingery L.B. and
Williams R.J. Nutritional requirements of the
pathogenic mold. *Trichophyton*
interdigitale.
Plant. Physiol. 2, 795-806 (1936)

45. Nannizzi, A. Ricerche sui rapporti morfologici e
biologici tra *Gymnosaceae* e
Dermatomiceti.
Ann. Mycologici 24, 85-129 (1945)

46. Nelson, Ciaccio
and Hesse A rapid method for the quantitative
assay of proteolytic enzymes.
Anal. Chem. 2, 39-44 (1961)

47. Nickerson, W.J.
and Williams J.W. Pathogenic Fungi.
Chronica Botanica Comp.
Waltham Mass. (1947)

48. Paldrock, H. The effect of temperature on the
growth and development of dermato-
phytes.
Acta Derm. venereol. 35, 1-30 (1955)

49. Phinney, B.O. and
West C.A. Gibberellins as native plant
regulators.
Ann. Rev. Plant. Physiol. 2, 436-511
(1960)

50. Polakis, E.S. and
Bartley H. Changes in dry weight, protein
deoxyribonucleic acid, ribonucleic
acid and reserve and structural
carbohydrate in the aerobic growth
cycle of yeasts.
Biochem. J. 98, 883-887 (1966)

51. Popoff, J. and
Ivanoff T. Fungizides synthetiques. I. L'action
antimycotique des Substances du
Type des Phytohormones et des
Derives naphthaleniques ss-substi-
tues.
Compt. rend. acad. bulgare sci. 6, 37-40
(1953)

52. Raubitschek, F. Nutritional requirements of dermatophytes continuous shake cultures. *J.invest.Derm.* 25, 83-87 (1955)

53. Raubitschek, F. The morphology of the pseudoparasitic phase of some dermatophytes. *Mycopathologia(Den Haag)* 12, 111-123 (1960)
 and Evron Maoz R.S.

54. Refai, M. und Änderung des pH-Wertes der Nährböden durch Dermatophyten.
 Rieth H. *Zbl. Bact. I. Orig.* 194, 114-121 (1964)

55. Righelato, R.C. Improved control of organisms concentration in continuous cultures of filamentous microorganisms. *J.Appl.Bact.* 30, 246-250 (1967)
 and Pirt

56. Rippon, J.W. and The elastases of Pathogenic fungi and Actinomycetes. *J.invest.Derm.* 50, 57-58 (1967)
 Varadi D.

57. Robbins, W.J. Growth requirements of the dermatophytes. *Ann.New York Acad.Sci.* 50, 1357-1361 (1945)

58. Robbins, W.J. and Vitamin deficiencies of the filamentous fungi. *Bot.rev.* 8, 411-471 (1942)
 Kavanagh V.

59. Robbins, W.J. and Growth factors for Trichophyton mentagrophytes. *Am.J.Bot.* 32, 509-523 (1945)
 Ma R.

60. Robbins, W.J. and Effect of hydroxyproline on Trichophyton mentagrophytes and other fungi. *Amer.J.Bot.* 33, 638-647 (1946)
 McJveigh J.

61. Rücker, M.M. Experimentelle Untersuchungen über das Wachstum hautpathogener Pilze in vitro und die fungistatische Wirkung chemischer Substanzen. Dissertation Heidelberg (1951)
62. Sabouraud, R. Les Teignes. Masson et Cie Paris (1910)
63. Sen, C. Enzyme make up of Trichophyton mentagrophytes and Trichophyton rubrum. I. Aldolase Activity. Mycopathologia (Den Haag) 24, 211-219 (1964)
64. Sen, C. Enzyme make up of Trichophyton rubrum and Trichophyton mentagrophytes. II. Amylaseactivity. Mycopathologia (Den Haag) 24, 220-227 (1964)
65. Silva, N. and Benham R.W. Nutritional studies of the dermatophytes with special reference to Trichophyton mengnini Blanchard 1896 and Trichophyton gallinae. (Mengnin 1881) comb.nov. J.invest.Derm. 18, 453-472 (1952)
66. Steppert, A. Zur Diagnose, Klinik, Therapie und Prophylaxe von Dermatomykosen. Ther.Gegenw. 5, 104-107 (1965)
67. Stockdale, Ph.M. Nutritional requirements of the dermatophytes. Biological reviews of the Cambridge Phil.Soc. 28, 84-104 (1953)
68. Swansson, R. and Stock J.T. Biochemical alterations of dermatophytes during growth Appl.Microbiol. 14, 438-461 (1966)

69. Taber, W.A.
et al. Measurement of growth in liquid cultures of molds.
Appl.Microbiol. 13, 827-829 (1965)
70. Taplin, D.J. The use of Gentamycin in mycology media.
J.invest.Derm. 45, 549-550 (1965)
71. Tate, P. On the enzymes of certain dermatophytes.
Parasitology 21, 31-48 (1929)
72. Thianprasit, M.
und Braun-Falco O. Zum histochemischen Enzymnachweis in hautpathogenen Pilzen. I zur Methodik.
Arch.Klin.Exp.Derm. 221, 175-183 (1965)
73. Thompson, K.W. Rept. Conf. on Dermatophytes,
Div. Med. Sciences, Nat. Res. Council; (1943)
74. Trinci A.P.J. A kinetic study of the growth of *Aspergillus nidulans* and other fungi.
J.gen.Microbiol. 57, 2 (1969)
75. Verujsky, D.M. Recherches sur la morphologie et la biologie du *Trichophyton tonsurans* et del *Achorion Schoenleinii*.
Ann.Inst. Pasteur 1, 369-372 (1887)
76. Weidman, F.D. The physical requirements of some pathogenic fungi.
Arch.Derm.Syphilol. 15, 415-418 (1927)
77. Went, F.W. Wuchsstoff und Wachstum.
Rec.trav.bot.neerl. 25, 1-116 (1928)

78. Williams, J.W. Subsurface growth of pathogenic fungi on peptone, hair, skin and cystein-cystin mediums. Arch.Derm.Syph. (Chic.) 36, 581-598 (1937)
79. Yu. R.J. et al. Isolation and purification of an extracellular enzyme of Trichophyton metagrophytes. J.Bact. 96, 1435-1436 (1968)
80. Zalay et al. The application of antifoam silicones in the microbiol fermentation technic. Zbl.Bact. (Orig) 197, 118-126 (1965)
81. Ziegler, H. Die Ektoenzyme der Dermatophyten.I. Derm.Wochenschr. 151, 577-593 (1965)
82. Ziegler, H. Die Ektoenzyme der Dermatophyten.II. Derm.Wochenschr. 226, 282-290 (1966)
83. Ziegler, H. Die biologischen Grundlagen der Pathogenität der Dermatophyten. Symp.d.dtschspr.Mykolog.Ges. Freiburg (1964)
84. Ziegler, H. Die Ausscheidung von Enzymen zum Abbau von Polysachariden, Lipiden und Proteinen durch Dermatomyceten in vitro. 2.Tagg.d.Ges.f.med.Mikrobiol. Leipzig(1964)
85. Ziegler, H. und Böhme H. Untersuchungen über den Stoffwechsel der Dermatomyceten. Mykosen 5, 1-17 (1962)

Für die Überlassung des Arbeitsplatzes zur Durchführung der Dissertation bin ich dem Direktor der Dermatologischen Klinik der Universität München, Herrn Prof. Dr. med. Braun-Falco, zu großem Dank verpflichtet.

Größten Dank schulde ich meinem Lehrer, Herrn Prof. Dr. med. Wolf Meinhof, unter dessen Anleitung und nach dessen Ideen ich meine Dissertation anfertigen konnte.

Die Durchführung der Untersuchungen wurde durch die dankenswerte Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft ermöglicht.

Lebenslauf

Geboren am 4.7.1945 in Bad Tölz

Von 1951 bis 1955 Besuch der Volksschule in Bad Tölz

Von 1955 bis 1964 Besuch der Städtischen Oberrealschule
in Bad Tölz. 1964 Abschluß mit Reifeprüfung

1964 Beginn des Medizinstudiums an der Universität München

Im Februar 1971 Abschluß des Medizinstudiums nach 12 Semestern mit Bestehen des Staatsexamens an der Universität München.

Von 1.3.71 bis 30.6.71 Medizinalassistent an der Chirurgischen Abteilung des Städt. Krankenhauses in Bad Tölz.

Von 1.7.71 bis 30.9.71 Medizinalassistent an der Dermatologischen Klinik der Universität München.

Von 1.10.71 bis 29.2.72 Medizinalassistent an der II. Medizinischen Klinik der Universität München.

Am 1.3.72 Erteilung der Approbation als Arzt.

Seit 5.10.72 Assistent an der Klinik für Radiologie der Universität München.

